

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON ÉNFASIS EN
INOCUIDAD ALIMENTARIA

“Detección de elementos transgénicos en alimentos mediante la reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (QRT-PCR)”.

Yesselys Silvera Espinosa

Asesora: Dra. Mariel Monrroy

Co-asesores

Dr. José Renán García M.

Dr. Heriberto Franco

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de:
Magíster en Ciencias Químicas con Énfasis en Inocuidad Alimentaria

Panamá, Diciembre del 2020

Declaración Jurada

Yo, Yesselys Silvera Espinosa con cédula de identidad personal 4-721-1085 declaro bajo juramento que el trabajo presentado titulado "Detección de elementos transgénicos en alimentos mediante la reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (QRT-PCR)" es producto de un trabajo propio finalizado durante el año 2020 .En tal sentido, manifiesto la originalidad de la investigación realizada, la interpretación de datos, presentación de resultados con datos verídicos y las conclusiones, dejando establecido que aquellos aportes intelectuales de otros autores, han sido referenciado debidamente en el texto de dicho trabajo.



Yesselys Silvera Espinosa

Agradecimiento

Agradezco a Dios en primer lugar por permitirme culminar con éxito este proyecto de investigación. También quiero agradecer a mis padres y mi hermana por su apoyo incondicional en el desarrollo del mismo.

A los profesores José Renán García y Mariel Monroy por permitirme participar en las líneas de investigación que desarrollan y por compartir los conocimientos, para desarrollar la presente investigación.

De igual forma quiero agradecer al CIBQUIA- UNACHI por la capacitación en herramientas moleculares, la disposición de las instalaciones y equipos para poder desarrollar la investigación.

Al equipo de trabajo del CIBQUIA por el apoyo en cada una de las actividades. A SENACYT por creer en mí al otorgarme la oportunidad de desarrollarme como investigadora y financiar este proyecto.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a Dios porque sin él no hay nada posible, a mi hijo Daniel Núñez y a mi familia por el apoyo recibido durante la realización de este proyecto de investigación.

Tabla de Contenidos

Agradecimiento	iv
Dedicatoria	v
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
Lista de anexos	xiii
Introducción	xiv
Resumen	xvii
1.0 Aspectos generales	1
1.1 Antecedentes del problema.	1
1.1.1 Etiquetado de productos alimenticios genéticamente modificados	5
1.2 Planteamiento del problema y situación actual	11
1.3 Hipótesis	18
1.4 Objetivos	18
1.4.1 Objetivo general	18
1.4.2 Objetivos específicos	18
1.5 Delimitación, Alcance o Cobertura.	18
1.6 Restricciones y/o Limitaciones.	18
2.0 Marco Teórico	20
2.1 El Ácido Desoxirribonucleico (ADN)	20
2.2 Organismos Genéticamente Modificados	21

2.3 Métodos para obtener un transgénico	23
2.3.1 Métodos Indirectos	23
2.3.1.1 La bacteria <i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	23
2.3.1.2 Vectores transposones	24
2.3.2 Métodos directos	24
2.3.2.1 La biobalística	24
2.3.2.2 La electroporación	25
2.3.2.3 Sonicación	25
2.3.2.4 Microinyección	26
2.3.2.5 Microláser	26
2.3.2.6 La transformación de protoplastos	26
2.3.2.7 Transferencia mediada por sustancias químicas	27
2.3.3 Nuevas Técnicas de Fitomejoramiento (NPBT)	27
2.4 Construcción de un transgén o inserto	28
2.4.1 El promotor	28
2.4.2 Región codificante	29
2.4.2.1 Gen cry y las proteínas que codifica	29
2.4.2.2 Los genes pat y bar y las proteínas que codifican	30
2.4.3 Terminador	31
2.5 Métodos para determinar OGM en alimentos	31
2.5.1 Detección basada en expresión proteica	32
2.5.2 Detección basada en análisis de ácidos nucleicos	33

2.5.2.1 PCR	33
2.5.2.1.1 Etapas de una PCR convencional	35
2.5.2.1.2 Insumos necesarios para la PCR	37
2.5.2.2 PCR en tiempo real (QRT- PCR o qPCR)	38
2.5.2.2.1 PCR en tiempo real utilizando SYBR Green	39
2.5.2.2.2 Análisis de la curva de fusión o High Resolution Melt (HRM)	41
2.5.2.3 Nuevas técnicas para la detección de OGM en alimento	41
2.5.2.3.1 Multiplex PCR	41
2.5.2.3.2 Biosensores de ADN	42
2.5.2.3.3 Secuenciación de próxima generación (NGS)	43
2.5.2.3.4 Microarreglos	43
2.5.2.3.5 PCR digital	44
2.6 Argumentos a favor y en contra de los OGM	44
3.0 Marco de aspectos metodológicos	47
3.1.1 Definición	47
3.1.2 Justificación	48
3.2 Sujetos o fuentes de información	48
3.2.1 Fuentes	48
3.2.2 Equipo y materiales de laboratorio	49
3.3 Muestra	49
3.3.1 Tipo de muestreo	51
3.3.1.1 Selección de elementos muestrales	51

3.4 Métodos e instrumentos de investigación	51
3.4.1 Procedimiento Experimental	51
3.4.1.1 Extracción y purificación del ADN	51
3.4.1.1.1 Lisis	52
3.4.1.1.2 Captación de ADN y lavados	53
3.4.1.1.3 Recuperación de ADN de columnas	54
3.4.1.2 Diseño de partidores	54
3.4.1.3 Método para la detección de elementos transgénicos	56
3.4.1.3.1 PCR en tiempo real	57
3.4.1.3.1.1 Preparación de la mezcla de reacción	57
3.4.1.3.1.2 Condiciones de temperatura de la PCR	57
3.4.1.3.1.3 Condiciones para la captación de la fluorescencia	58
3.4.1.3.1.4 Equipo y placas de reacción	58
3.4.1.3.1.5 Obtención de curvas de fusión para el análisis HRM	58
3.4.1.3.2 PCR convencional o de punto final	59
3.4.1.3.2.1 Condiciones para las reacciones y temperaturas de la PCR	59
3.4.1.3.2.2 Visualización de los productos de PCR obtenidos en geles de agarosa	59
3.4.1.3.3 Secuenciación	60
3.4.1.3.3.1 Tratamiento de la información	60
4.0 Análisis e interpretación de resultados	61
4.1 Selección y recolección de muestras	61

4.2 Extracciones de ADN	61
4.3 Los partidores para la identificación de elementos transgénicos mediante QRT-PCR	66
4.4 Detección de elementos transgénicos por qRT-PCR	70
4.5 Secuenciación	80
Conclusiones	88
Recomendaciones	90
Referencias Bibliográficas	91
Anexos	117

Lista de tablas

Tabla 1. Textos relacionados con el etiquetado de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos elaborados por el Codex Alimentarius.	7
Tabla 2. Importación según tipo de alimento a Panamá	11
Tabla 3. Principales productos estadounidenses exportados a Panamá	13
Tabla 4. Solicitudes de cultivos presentados a la Comisión de Bioseguridad	14
Tabla 5. Alimentos muestreados en los supermercados de la ciudad de David	50
Tabla 6. Hojas muestreadas	51
Tabla 7. Partidores empleados para el análisis	56
Tabla 8. Rango de concentraciones y valores de la relación de absorbancia medidos a 260 nm/280 nm obtenidos para muestras de ADN de alimentos	64
Tabla 9. Concentración y valores de la relación de absorbancia medidos a 260/280 nm obtenidos para muestras de ADN de hojas.	66
Tabla 10. Características de los partidores empleados para detectar los elementos transgénicos en alimentos procesados y hojas.	69
Tabla 11. Detección de elementos transgénicos en alimentos	73
Tabla 12. Porcentaje de positividad de elementos transgénicos por tipo de producto asociado al país de origen	75
Tabla 13. Detección de elementos transgénicos en hojas de maíz y arroz	77
Tabla 14. Regiones amplificadas por PCR convencional para posterior secuenciación de muestras	81

Lista de figuras

Figura 1. Área cultivada con transgénicos en el mundo	3
Figura 2. Leyes de Etiquetado de OGM en el mundo	10
Figura 3. Alimentos y bebidas importados a Panamá durante el 2018	12
Figura 4. Estructura de ADN	20
Figura 5. Constructo del gen	28
Figura 6. Representación de un evento transgénico tipo y los cuatro niveles para el análisis de OGM en alimentos.	34
Figura 7. Etapas de la PCR	36
Figura 8. Detección de productos de amplificación mediante SYBR Green	40
Figura 9. Metodología	47
Figura 10. Relación de absorbancias versus tipo de alimento	65
Figura 11. Curvas de disociación o fusión para algunas muestras analizadas	79
Figura 12. Productos de amplificación para el promotor CAMV35S y el gen bar por PCR convencional	85
Figura 13. Productos de secuenciación de la reacción M55-P-56	86
Figura 14. Resultados obtenidos por secuenciación alineados con la secuencia del t-NOS	87

Lista de anexos

Anexo 1. Lista de alimentos analizados	117
Anexo 2. Muestras compradas utilizadas en el análisis	120
Anexo 3. Kit de extracción de ADN de Thermofisher Scientific	121
Anexo4. Preparación de muestras para la extracción de ADN	122
Anexo 5. Proceso de extracción de ADN de las muestras	123
Anexo 6. Muestra con el buffer de lisis 1 durante el proceso de extracción	124
Anexo 7. Muestras de ADN extraída de los alimentos	125
Anexo 8. Determinación de la concentración y pureza del ADN con el equipo Nanodrop 2000	126
Anexo 9. Preparación de la placa de reacción óptica para la detección qRT-PCR	127
Anexo 10. Equipo utilizado para PCR en tiempo real	128
Anexo 11. Preparación de las muestras para PCR convencional	129
Anexo 12. Colocación de los microtubos en el termociclador para PCR convencional	130
Anexo 13. Colocación de las muestras sobre gel de agarosa	131
Anexo 14. Electroforesis en gel de agarosa	132

INTRODUCCIÓN

A través de la historia el hombre siempre se ha preocupado por mejorar los alimentos que produce, la biotecnología ha sido una herramienta que ha permitido ese logro. De esta manera, en 1986 se creó la primera planta transgénica, una planta de tabaco a la cual se añadió a su genoma un gen de resistencia a la Kanamicina. Luego en 1994 se aprobó en Estados Unidos la comercialización del primer alimento transgénico, de la empresa Calgene (Baltá et al., 2012).

A partir de esta fecha se ha estado manipulando biotecnológicamente el ADN de muchos alimentos, con el fin de conseguir cultivos más resistentes a las inclemencias del tiempo, a los insectos, y a otras plagas. En un principio, el objetivo de la manipulación genética era fabricar la primera generación de transgénicos: generar cultivos más productivos y de esta manera beneficiar al agricultor. Sin embargo, el hombre no se detuvo allí y desarrolló la segunda generación de transgénicos diseñados para la obtención de plantas con características nutricionales y organolépticas mejoradas, logrando por ejemplo aumentar el contenido vitamínico en algunos cultivos, como por ejemplo el arroz biofortificado y de esta manera sintetizar productos que beneficien al consumidor (Bagwan et al., 2010; Potrykus, 2001).

Actualmente sabemos que existe una tercera generación de transgénicos destinados a producir vacunas, medicamentos e incluso plásticos y telas, convirtiendo a las plantas en verdaderas industrias, que incluso mucho de ellos lo utilizamos desde hace décadas y no lo sabemos. Un ejemplo claro es la insulina, quizás la sustancia transgénica más común en el mundo de la salud, la cual se produjo por primera vez en 1978, el procedimiento llevado a cabo fue utilizando bacterias *Escherichia coli*, como factorías en miniatura para producir de forma separada las cadenas A y B de la insulina humana, introduciendo para ello los genes que las codifican en las bacterias mediante un vector. El resultado fue la insulina humana denominada comercialmente como Humulin, más barata, potente y segura, ésta empezó a distribuirse a principios de los años 80 como tratamiento contra la

diabetes, siendo la primera proteína recombinante aprobada como medicamento (Alvarado et al.,2019).

Aunque se han podido verificar los beneficios de muchos organismos genéticamente modificados, todavía hay mucha controversia respecto a la inocuidad de los mismos en la salud humana. Entre los factores que han originado estas controversias, están la falta de estudios a largo plazo del consumo de los alimentos transgénicos y sus efectos en humanos y animales, pues a pesar que en algunos países se han llevado a cabo, los científicos a nivel mundial aún no se ponen de acuerdo, generando grandes debates y produciendo argumentos a favor y en contra de los organismos genéticamente modificados (Fu et al., 2021; Baghbani et al.,2021; Wilson et al.,2021;). Los seres humanos hemos estado en contacto con los organismos genéticamente modificados desde hace tiempo, sin embargo, muchas veces no lo sabemos, porque no investigamos y las empresas que comercializan dichos productos muchas veces no indican en su etiqueta, lo que realmente consumimos (Center for food safety, 2020;Brara et al.,2020;Barbuceanu et al.,2021; Grammenos et al., 2021).En algunos países, especialmente en los países europeos, están bien organizados, ya que tienen leyes que regulan el consumo de los productos transgénicos y OGM, obligando a las empresas a realizar rigurosos controles para su posterior etiquetado, esto da seguridad al consumidor, pues el ciudadano está consciente de la calidad e inocuidad de los alimentos que compra y que va a consumir.

Es alarmante pensar que en nuestro país no existe la implementación de leyes sobre etiquetado de productos transgénicos, a pesar de que existe un proyecto de ley, éste aún no se ha aprobado. Además, no se realizan controles de ningún tipo a los alimentos que se importan provenientes de países productores de transgénicos, principalmente por la falta de laboratorios y de equipos que puedan realizar este trabajo, para de esta manera garantizar la inocuidad alimentaria de los alimentos que se consumen en el país. Es necesario que se realicen análisis de rutina para detectar si el contenido de OGM en alimentos procesados que se encuentran en los supermercados y comercios panameños, se encuentran dentro de los límites

establecidos por las normas Internacionales. Es por ello, que esta investigación pretende detectar elementos transgénicos en alimentos mediante la reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (QRT-PCR) y de esta manera garantizar la seguridad alimentaria de nuestra población.

RESUMEN

Actualmente la producción de cultivos transgénicos ha tenido un gran auge a nivel mundial, debido a que estos cultivos pueden solventar distintos problemas que se presentan en la agricultura tradicional. Es por ello que últimamente ha habido un crecimiento continuo en la adopción de la tecnología y en la comercialización de alimentos y piensos transgénicos en todo el mundo. Sin embargo, la comunidad científica no se pone de acuerdo en cuanto a la inocuidad de los mismos. En este sentido es necesario que el consumidor tenga acceso a la información de los alimentos que consume, es por ello que hoy día los gobiernos y organizaciones han desarrollado métodos para detectar rápidamente y con alto rendimiento los alimentos y piensos derivados. El gobierno de Panamá aún no ha designado un laboratorio donde se realice el análisis de alimentos transgénicos que se importan o que se produzcan en la región. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de secuencias de ADN derivadas de maíz y soya GM, en alimentos procesados, comercializados en la ciudad de David. Se diseñaron y obtuvieron partidores con características deseables para los genes transgénicos bar, cry1Ab, pat, el promotor 35s y el terminador t-NOS, empleando los programas Gene Bank y Primer Express. Con estos partidores y empleando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, se logró identificar la presencia de elementos transgénicos en el 50,9% de las muestras analizadas tanto nacionales como extranjeras, siendo los genes bar y t-NOS los encontrados con mayor frecuencia. Los resultados demuestran que existen alimentos procesados derivados de cultivos genéticamente modificados (GM) en el mercado local y cultivos de maíz y arroz que son transgénicos. Es necesario que se implementen leyes que regulen el etiquetado de los productos OGM en Panamá y se realicen estudios cuantitativos en análisis de rutina para detectar el contenido de OGM en los alimentos. Cabe destacar que en Panamá existe la capacidad científica y tecnológica local para realizar este tipo de estudios, un ejemplo es el Centro de Investigación en Bioquímica y Química Aplicada (CIBQUIA), un centro científico en el cual se vienen desarrollando investigaciones en esta línea y en donde se han implementado

metodologías para la detección de OGM, por tanto, estos recursos pueden emplearse para monitorear los alimentos que entran al país.

CAPÍTULO 1. ASPECTOS GENERALES

1.1 Antecedentes del problema

La biotecnología moderna ha facilitado el intercambio de material genético entre especies distintas, algo difícil de realizar por métodos naturales. Esto ha generado nuevas generaciones de organismos, tanto de plantas como de animales con características que han permitido al hombre mejorar la producción de alimentos. Sin embargo, los transgénicos en general y los animales transgénicos en particular han generado mucha controversia alrededor del mundo. (Campos, 2014; Oliver, 2014; Zhang, Wohlhueter Zhang, 2016; Wilson, 2021). Una de las causas que genera la polémica discusión, según algunos autores, se debe a que la consolidación de la industria de las semillas transgénicas, implica una disminución de las oportunidades para los agricultores y el aumento de la vulnerabilidad de las comunidades campesinas (Lombardo, 2014; McMichael, 2021). A este problema se suma el riesgo de seguridad alimentaria mundial cuyas opciones se reducen aún más con el aumento de la contaminación transgénica que invade los cultivos tradicionales y orgánicos (Campos, 2014; Jurat et al., 2021). Por otra parte, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO diferentes presiones como el rápido crecimiento demográfico, la urbanización, el aumento de la riqueza y los consiguientes cambios en los hábitos de consumo están poniendo a prueba la capacidad de los sistemas alimentarios para proporcionar alimentos nutritivos y ayudar a ofrecer mejores oportunidades de subsistencia de forma ambientalmente sostenible (FAO, 2021). Según los últimos cálculos de la ONU, la población mundial pasará aproximadamente de los 6 800 millones de personas a 9100 millones en 2050. Al respecto, las empresas productoras de organismos modificados genéticamente (OMG) afirman que la solución está en tecnologías modificadas genéticamente, y que estas pueden llegar a suplir el hambre mundial (Oliver, 2014; FAO, 2009; FAO 2021; Guleria, y Kumar, 2021).

A pesar de la controversia surgida alrededor de los alimentos transgénicos, es un hecho que en los últimos años la superficie dedicada a la producción de cultivos transgénicos se ha multiplicado. Prueba de ello es que en el informe sobre

crecimiento de los cultivos transgénicos en el mundo 2019, que publicó ISAAA (Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agro-biotecnológicas) se destaca que 29 países cultivaron 190,4 millones de hectáreas de productos modificados genéticamente (ISAAA,2019). Según el informe presentado por ISAAA, de los 29 países que adoptaron los cultivos transgénicos, 24 son países en desarrollo y 5 son países industriales. Los países en desarrollo aumentaron el 56% de la superficie mundial de cultivos biotecnológicos en comparación con el 44% de los países industrializados. Otros 42 países (16 más 26 países de la UE) importaron cultivos biotecnológicos para alimentos, piensos y procesamiento. Así, un total de 71 países han adoptado cultivos biotecnológicos (ISAAA,2019).

En la **Figura 1** se puede observar los principales países productores de alimentos transgénicos, entre los que están Estados Unidos, Brasil, Argentina, Canadá e India. En estos países con largos años de producción de estos cultivos, las tasas de adopción de los principales cultivos están en niveles cercanos al 100%, lo que indica que los agricultores prefieren esta tecnología de cultivo en lugar de las variedades convencionales (ISAAA,2019).



Figura 1. Área cultivada con transgénicos en el mundo (ISAAA,2019).

La soja fue el principal cultivo biotecnológico con 91,9 millones de hectáreas que ocuparon el 48% de la superficie mundial de cultivos biotecnológicos, a esto le siguen el maíz (60,9 millones de hectáreas), el algodón (25,7 millones de hectáreas) y la canola (10,1 millones de hectáreas) (ISAAA,2019). Los cultivos biotecnológicos se han expandido más allá de los cuatro grandes (maíz, soja, algodón y canola) para brindar más opciones a muchos de los consumidores y productores de alimentos del mundo. Estos cultivos biotecnológicos incluyen alfalfa (1,3 millones de hectáreas), remolacha azucarera (473.000 hectáreas), caña de azúcar (20.000

hectáreas), papaya (12.000 hectáreas), cártamo (3.500 hectáreas), patatas (2.265 hectáreas), berenjena (1.931 hectáreas) y menos de 1,000 hectáreas de calabaza, manzana y piña. Además, las investigaciones de cultivos biotecnológicos realizadas por instituciones del sector público incluyen arroz, banano, papa, trigo, garbanzo, gandul y mostaza con varios rasgos de calidad nutricional y de importancia económica beneficiosos para los productores y consumidores de alimentos en los países en desarrollo (ISAAA,2019).

La tolerancia a herbicidas ha sido de manera consistente la característica dominante en los cultivos modificados liberados comercialmente. Los cultivos estrella son aquellos que tienen incorporada la resistencia a un herbicida (gen pat o bar), que ocupan el 47% de la superficie cultivada, seguidos de las variedades con ambas características (42%) y de las variedades insecticidas Bt (genes crys) (12%) (ISAAA,2019). Así, los alimentos comunes que contienen maíz o jarabe de maíz de alta fructosa (cereales de desayuno, aperitivos, soda), soja y aceite de canola podrían haber modificado genéticamente sus componentes (Kramkowska et al., 2013).

1.1.1 Etiquetado de productos alimenticios modificados genéticamente

Para entender el proceso de etiquetado en productos alimenticios modificados genéticamente es necesario primero definir qué es un alimento transgénico. Los alimentos transgénicos son aquellos que contienen más de un cierto contenido mínimo legal de materias primas obtenidas a partir de organismos modificados genéticamente (OGM) (FAO,2004). Por otra parte, la Unión Europea (UE) define a los alimentos modificados genéticamente como aquellos que contienen o están compuestos por OGM o han sido producidos a partir de ellos (UE, 2003a). Según el Reglamento 1830/2003 de la Unión Europea, (UE ,2003b), existen tres formas en la que podemos encontrar un alimento transgénico:

-Cultivos que pueden utilizarse de manera directa como un alimento y que hayan sido modificados genéticamente. Por ejemplo, la soya modificada para ser resistente frente a un herbicida o a una plaga en particular y se emplea para la obtención de aceite (Clemente y Cahoon,2009; Bogani.et al, 2009; Natarajan et.al, 2013). Otro ejemplo es el maíz usado como alimentos de animales y humanos resistente a plagas, también conocido como maíz Bt.12, del cual se obtienen productos como tortillas, empanadas, etc. (Oviedo et al., 2020; De Vos y Swanenburg, 2018).

-Alimentos cuya composición contenga algún ingrediente o aditivos que hayan sido modificados genéticamente. Aquí se puede mencionar a los extensores de los alimentos cárnicos como embutidos y otros que poseen soya transgénica (Gómez, 2003; Leimanis et al., 2006; Soares et al.,2010; Wang et al.,2019).

-Alimentos que se hayan producido a partir de algún auxiliar genéticamente modificado. Por ejemplo, en la elaboración de algunos quesos se utiliza una enzima llamada quimosina, que se puede producir de forma alternativa mediante ADN recombinante, a partir de la manipulación genética de los hongos *Aspergillus Níger*

var awamori y *Kluyveromyces lactis* y de la bacteria *Escherichia coli*. o a partir de la planta del tabaco (O'Sullivan y Fox, 1991; Wei et al.,2016).

La inocuidad de los alimentos es motivo de preocupación entre los consumidores de muchos países, pues los mismos desean estar seguros de que los productos modificados genéticamente que llegan al mercado han sido sometidos a ensayos apropiados (Hartman ,2014; Larrión 2016; Robayo et al.,2018; Schouteten et al., 2018). El Codex Alimentarius, o "Código Alimentario", es un conjunto de normas, directrices y códigos de prácticas aprobados por la Comisión del Codex Alimentarius. La Comisión, tiene como finalidad de proteger la salud de los consumidores y promover prácticas leales en el comercio alimentario (FAO/WHO, 2020a). El enfoque que utiliza el Codex para evaluar los riesgos de los OMG se basa en el concepto de equivalencia sustancial, que reconoce que el principal objetivo de etiquetar los alimentos genéticamente modificados no es establecer una inocuidad absoluta, sino establecer qué tan diferente es de su homólogo tradicional, cuando exista ese homólogo (FAO,2000). En la **Tabla 1** se pueden observar la recopilación de textos pertinentes del Codex Alimentarius relacionadas con el etiquetado de alimentos derivados de la biotecnología moderna.

Tabla 1 Textos relacionados con el etiquetado de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos elaborados por el Codex Alimentarius

Nombre del texto	Código y otras directrices
1- Norma General del Codex para el Etiquetado de los Alimentos Preenvasados	(Norma Codex 1-1985); y en particular las Secciones 3.1, 3.2, 4.1.1, 4.1.2, 4.2.2, 7.1
2- Directrices Generales del Codex sobre Declaraciones de Propiedades	(CAC/GL 1-1979); y en particular las Secciones 1.2, 1.3, Sección 2 – Definición de Declaración de Propiedades, 3.3, 3.5, 4.1, 5.1 (iii), 5.1 (iv), 5.1 (v), 5.1 (vi)
3-Directrices Generales del Codex sobre Declaraciones de Propiedades Nutricionales y Saludables	(CAC/GL 23-1997); La Introducción y en particular las Secciones 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5
4- Directrices para la Producción, Elaboración, Etiquetado y Comercialización de Alimentos Producidos Orgánicamente	(CAC/GL 32-1999); y en particular la Sección 1.5
5- Directrices Generales para el uso del Término “Halal”	(CAC/GL 24-1997)
6-Principios Prácticos sobre el Análisis de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos Aplicables por los Gobiernos	(CAC/GL 62-2007)
7- Principios para el Análisis de Riesgos de Alimentos derivados de la Biotecnología Moderna	(CAC/GL 44-2003); y en particular el Párrafo 19.
8- Directrices para la Realización de la Evaluación de Inocuidad de Alimentos Obtenidos de Plantas de ADN Recombinante	(CAC/GL 45-2003)
9- Directrices para la Realización de la Evaluación de Inocuidad de Alimentos Obtenidos de Microorganismos de ADN Recombinante	(CAC/GL 46-2003)
10- Directrices para la Realización de la Evaluación de Inocuidad de Alimentos Obtenidos de Animales de ADN Recombinante	(CAC/GL 68-2008)

(Tomado de FAO/WHO,2020c).

Además del Codex Alimentarius, a nivel internacional también existe el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad, que es el primer acuerdo firmado bajo el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD). Su objetivo es garantizar un nivel adecuado de protección en el campo de la transferencia, manipulación y uso seguro de organismos vivos organismos modificados (OVM) resultantes de la biotecnología moderna y que puedan tener efectos adversos en conservación y uso sostenible de la diversidad biológicos, teniendo en cuenta los riesgos para la salud humana derivados del movimiento transfronterizo (Costa y Marin, 2011).

Aunque el Codex es la entidad internacional que regula las normas para evaluar la inocuidad de los OGM, faculta a los gobiernos nacionales a decidir libremente sobre el etiquetado de los OGM, es por ello que la legislación que regula los alimentos transgénicos varía de un país a otro, habiendo incluso países que no tienen leyes específicas que los regulen produciendo una enorme brecha entre los enfoques adoptados en diferentes países para el etiquetado de alimentos modificados genéticamente. La vigilancia ciudadana de información sobre los transgénicos y las semillas OGM inf OGM clasifica a las leyes de etiquetado de transgénicos como:

a-) Indeterminadas o poco claras: son las que no establecen umbral a pesar de ser obligatorias (Vilchez, 2017).

b-) Estrictas: son aquellas normas obligatorias que tienen un umbral de presencia de OGM en sus productos de un 0,1% a un 0,9%. Este tipo de etiquetas son las establecidas en la Unión Europea, Turquía, Australia (Ahmed, 2002; Costa & Marin, 2011; Castaño, 2017). La Comisión Europea definió el porcentaje de ADN modificado genéticamente: como el porcentaje del número de copias de ADN modificado genéticamente respecto al número de copias de ADN específico del taxón objetivo, calculado en términos de genomas haploides. Por ejemplo, si el producto contiene diferentes ingredientes (por ejemplo, maíz, soya, otros) cada uno de ellos puede contener hasta 0.9% de OGM (Castaño, 2017).

c-) Flexibles: son normas de carácter obligatorio que tienen los umbrales de presencia de entre el 1% y 5%. Es el caso de Brasil y Uruguay con el 1%, Corea del

Sur con el 3%, y Japón con el 5% (Costa y Marín 2011; Castaño, 2017; infOGM,2017). También es el caso de la nueva regulación de Estados Unidos que entró en vigencia en 2020 y determina un umbral del 5% para los alimentos que contienen transgénicos, los cuales deben ser etiquetados como producto de bioingeniería (USDA,2018). Voluntariamente con la Norma hasta el 31 de diciembre de 2021, de allí en adelante será de carácter obligatorio (USDA,2018). Existen dos modelos regulatorios sobre el etiquetado de OGM, en torno a los que se han desarrollado las regulaciones actuales, los cuales, de algún modo han dividido los países en torno a los mismos: un modelo “obligatorio” y otro “voluntario”. Adicionalmente, el etiquetado obligatorio varía entre países dependiendo si el enfoque regulatorio es basado en producto (que efectivamente haya presencia de trazas en el alimento final), o basado en proceso (el hecho que se haya empleado transgénesis para modificar un cultivo, haya o no trazas en el alimento final) (Costa y Marín, 2011; Castaño, 2017).

En la **Figura 2** se puede observar que las exigencias regulatorias, interpretación y grado de implementación varían significativamente entre los países. En América, por ejemplo, países como Estados Unidos, Canadá y Argentina no exigen un etiquetado estricto de transgénicos, siendo estos los tres principales productores de cultivos modificados genéticamente en el mundo. Por otra parte, en muchos países de Centroamérica como en Panamá, aún faltan legislaciones que regulen el etiquetado de estos productos y en algunos países a pesar que tienen leyes de etiquetado, las mismas no son claras pues no establecen umbral.

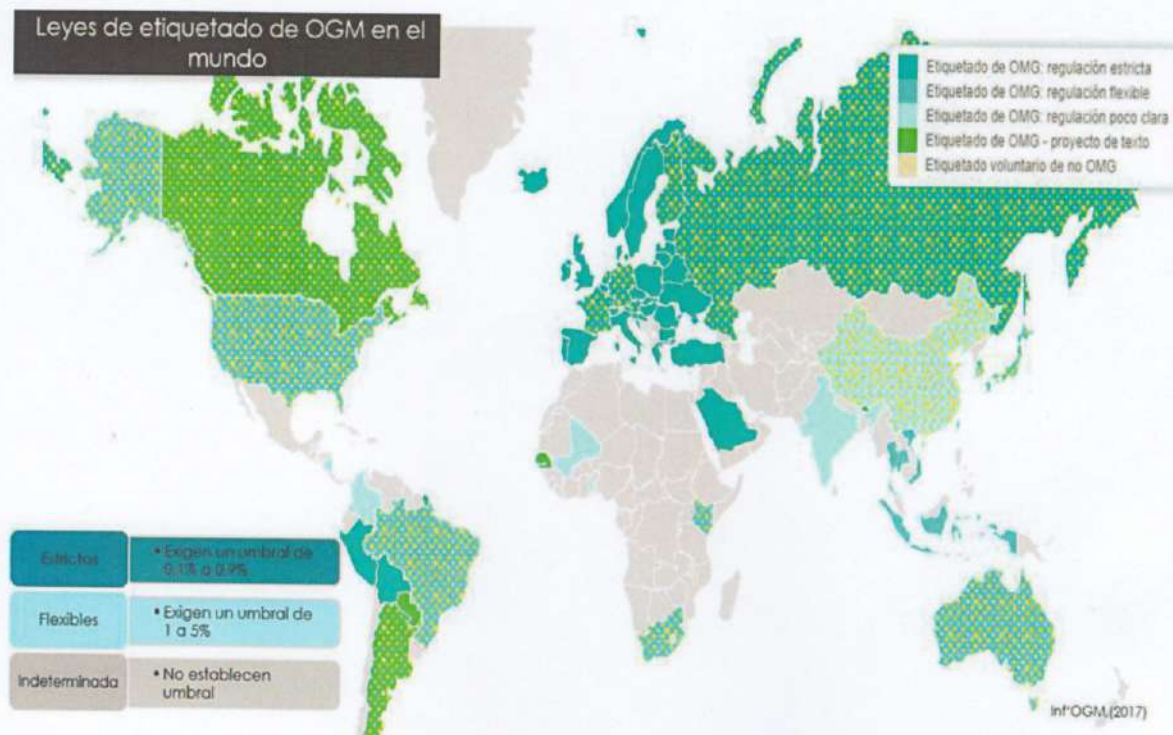


Figura 2. Leyes de Etiquetado de OGM en el mundo (InfOGM,2017).

Los umbrales son necesarios porque el límite de detección de las pruebas de ADN puede variar entre los laboratorios. También el tipo de matriz (muestra) influye en la sensibilidad de la técnica, puesto que cuanto más procesado sea un producto más difícil de detectar serán los OGM. En este sentido es necesario establecer si el umbral se establece a las materias primas o al producto final. El problema con la falta de reglamento es que las empresas productoras de alimentos pueden etiquetar sus productos de cualquier manera (letras pequeñas, logotipos confusos o escondidos en pliegues, etc), porque no hay una norma que diga cómo hacerlo. Es por ello que la norma de etiquetado de OGM de un país, así no cuente con umbrales, deberá definir si el etiquetado se realiza cuando se detecte la presencia de OGM en las materias primas o en los productos finales, pues sino pueden darse ambigüedades y esto conllevaría a la no implementación de las normas en dicho país. Actualmente muchos países de América tienen este problema.

1.2 Planteamiento del problema y situación actual

Panamá es un importador neto de alimentos, esto se puede observar en la **Tabla 2**, donde se puede percibir una gran diversidad de alimentos que van desde los cereales y derivados, aceites, leche y productos derivados, que son importados de distintos países y que además se encuentran comúnmente en los supermercados nacionales.

Tabla 2. Importaciones según tipo de alimento a Panamá (año 2017).

Grupo de alimentos	Toneladas métricas	Miles de balboas
Cereales y derivados	809,804	259,088
Raíces feculentas y tubérculos	29,433	42,405
Azúcares	14,218	25,969
leguminosas	22,914	26,759
Nueces y semillas oleaginosas	4,092	21,368
Hortalizas	45,276	53,152
Frutas	68,704	100,463
Carnes y despojos	40,309	110,889
Huevos	85	106
Pescados y mariscos	25,125	83,254
Leche y productos derivados	26,315	95,622
Aceites y grasas	62,439	90,086

(INEC,2017)

Por otra parte, en la **Figura 3** se puede observar que el principal proveedor de alimentos de Panamá es Estados Unidos. Prueba de ello es que en 2019 las importaciones de productos agrícolas y afines de Estados Unidos alcanzaron un estimado de \$ 610,7 millones (USDA/FAS,2019). Cabe destacar que según el informe Exporter Guide, que es una guía que se presenta al empresario norteamericano para hacer negocios en Panamá presentado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y el Servicio de Agrícola Extranjero (USDA/FAS), Panamá es uno de los mercados más grandes de Estados Unidos en

cuanto a alimentos se refiere y los productos orientados al consumidor alcanzaron \$ 357.4 millones en exportaciones en 2019.

Comidas y bebidas importadas a Panamá durante el 2018

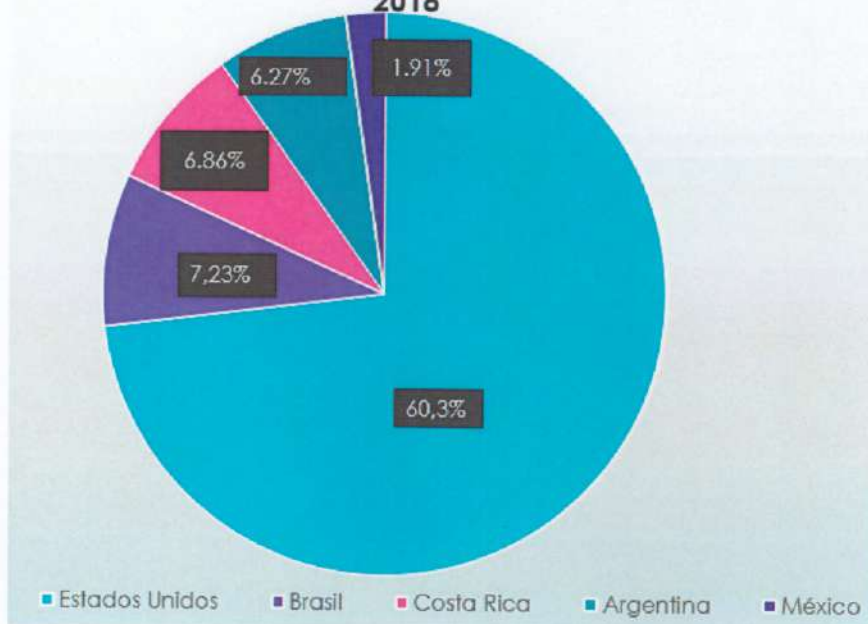


Figura 3. Alimentos y bebidas exportados a Panamá durante el 2018 (USDA/FAS,2020b).

En la **Tabla 3** se puede observar que dentro de los alimentos estadounidenses exportados a Panamá, muchos de éstos, son alimentos procesados que se encuentran regularmente en los supermercados del país como productos lácteos, bocadillos, salsas, carnes, comida preparada, entre otros.

Tabla 3. Principales productos estadounidenses exportados a Panamá orientados al consumidor en 2019

Tipo de producto	Millones de dólares
Productos lácteos	49,1\$
Comida preparada	46,1\$
Puerco y productos del puerco	31,9\$
Carne de aves y sus productos (ej: huevos)	31,0\$
Vino y cervezas	28,4\$
Bocadillos	27,6\$
Vegetales procesados	21,0\$
Bebidas no alcohólicas	17,7\$
Chocolates y productos a base de cocoa	14,4\$
Salsas y condimentos	14,1\$
Comidas para perros y gatos	12,7\$
Carne de vaca y productos	11,6\$

Tomado de(USDA/FAS, 2020b).

No obstante, Estado Unidos de América no es el único país de donde Panamá importan alimento, también importa alimentos de Argentina y Brazil, países altamente productores de alimentos transgénicos a nivel mundial. Por otro lado, en Panamá se han estado manipulando OGM de manera experimental. En la Provincia de Los Santos, específicamente en Azuero, se han realizado dos pruebas de campo con el maíz transgénico Herculex. Las pruebas fueron hechas en el período de siembra 2012-2013, donde se evaluaron 2011 bolsas de semillas de maíz (Bravo,sf). Se han realizado varias solicitudes de importación de alimentos transgénicos a la Comisión de Bioseguridad (**Tabla 4**).

Durante el 2013, la Comisión Nacional de Bioseguridad permitió el cultivo de maíz transgénico: dos variedades del grano amarillo y uno del blanco. La empresa MELO se encargó de distribuir las semillas entre los agricultores. El producto se importó de los Estados Unidos, con el compromiso de sembrarlo solo en las provincias de Los Santos y Herrera, con supervisión de la firma y técnicos del MIDA (FAO, 2012).

Tabla 4. Solicitudes de cultivos presentadas a la Comisión de Bioseguridad

Tipo de organismo	Características	Empresa solicitante y uso	Observaciones
Maíz	Maíz transgénico TC.1507 de Bayer Resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas glufosinato de amonio	Uso experimental de la semilla	
Maíz	Maíz transgénico Herculex I (DAS-1507-1) de DuPont-Pioneer	Importación de semillas, Este maíz va a ser usado por la empresa Melo para la producción de alimentos para la avicultura	La importación ha sido aprobada, pero como no se han establecido los mecanismos para su implementación. En las pruebas de campo se sembraron 2500 bolsas de semillas de este maíz
Arroz	LLRICE62	Importación del arroz transgénico para consumo humano	No se ha aprobado.

Fuente: USDA/FAS (2014)

Algunas empresas biotecnológicas han decidido no comercializar sus productos en Panamá, pues aún en el país no se han implementado leyes sobre bioseguridad y biotecnología. La empresa AquaBounty, empresa que se dedicaba a producir salmones transgénicos decidió cerrar puertas en Panamá debido a que la aprobación para la comercialización del salmón en territorio panameño requería

estudios adicionales a los ya realizados para las aprobaciones de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Canadá y Estados Unidos de América. La misma suerte corrió la empresa Pioneer, que intentó comercializar el maíz Herculex, sin embargo, se arrepintió ya que aún no ha establecido la implementación de leyes sobre bioseguridad y biotecnología en el país (USDA/FAS,2020c).

Panamá tiene un marco legal nacional para los OGM, el cual se basa en las siguientes leyes:

- 1) Ley 72 de 26 de diciembre de 2001, por la cual Panamá aprobó el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad, el cual entró en vigor el 29 de enero de 2000. Más tarde, el 3 de mayo de 2011 Panamá firmó el Protocolo Suplementario de Responsabilidad de Nagoya - Kuala Lumpur.
- 2) Ley 48 de 8 de agosto de 2002 que crea la Comisión Nacional de Bioseguridad para los Organismos modificados, y dicta otras disposiciones.
- 3) Ley 47 de 1996, que establece para la importación, exportación, investigación, experimentación, liberación al medio ambiente, reproducción y comercialización de plantas transgénicas, agentes de biocontrol y semillas para producción, y la Dirección Nacional de Sanidad Vegetal tiene aprobación.
- 4) Ley 23 de 1997, que regula la Sanidad Animal y Cuarentena Agrícola.
- 5) Decreto Ley 11 de 22 de febrero de 2006, que crea la Autoridad de Seguridad Alimentaria de Panamá (AUPSA) y las disposiciones para la importación, tránsito y movimiento transfronterizo de alimentos y piensos en Panamá.
- 6) La Ley 8 de 25 de marzo de 2015 crea Mi Ambiente institución que es la encargada de velar por que se cumplan los acuerdos del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad. (USDA/FAS,2020).

Según el marco legal panameño las autoridades competentes que deberán tomar la decisión final de aprobar o desaprobar un OGM, dependiendo de la recomendación de la Comisión Nacional de Bioseguridad para Organismos Genéticamente Modificados de Panamá son: Ministerio de Desarrollo Agropecuario

(MIDA), Autoridad panameña de Seguridad de Alimentos (AUPSA), Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), Ministerio de Salud (MINSAL), Ministerio de Comercio e Industria (MICI), Autoridad de Recursos Acuáticos de Panamá (ARAP), Autoridad de Protección al Consumidor y Defensa de la Competencia (ACODECO), Ministerio de Ambiente (MI AMBIENTE), cabe destacar que este último es la autoridad competente encargada de implementar el Protocolo de Cartagena de Bioseguridad (USDA/FAS,2020c).

En relación al etiquetado de alimentos genéticamente modificados, Panamá acepta la recomendación del CODEX Alimentarius para el etiquetado voluntario y no requiere etiquetado obligatorio específico para productos biotecnológicos. Sin embargo en el 2014, se presentó el proyecto de ley N° 046 que buscaba que los alimentos que contuvieran “semillas, ingredientes, elementos o aditivos genéticamente modificados” llevaran un sello en la etiqueta señalando que era un “Alimento transgénico”, pero el mismo fue cancelado y aún no hay evidencia de su aprobación. Cabe destacar que actualmente en Panamá no se está implementando ningún control referente a la comercialización de transgénicos en el país. Incluso aún, Panamá no ha determinado el estatus regulatorio o la política para biotecnologías innovadoras como la edición génica (USDA/FAS,2020c).

A pesar de que Panamá es parte del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad y además ratificó el Protocolo complementario de Nagoya -Kuala Lumpur sobre responsabilidad y compensación, en el territorio Istmeño aún no existen procedimientos claros en cuanto al proceso de aprobación y coordinación entre todos los organismos gubernamentales competentes encargados de autorizar la importación de organismos genéticamente modificados. Esta falta de coordinación puede deberse a que cada 5 años cambia de gobierno, cambian las leyes, el personal, e incluso cambian las instituciones, prueba de ello es que hasta el 2014 la institución encargada de implementar el Protocolo de Cartagena era el ANAM, sin embargo, a partir del 2015 se crea Mi Ambiente y ANAM deja de existir. Esta situación es preocupante pues en Panamá pese a que se han estado realizando pruebas experimentales con transgénicos, no existe aún la implementación de una

normativa clara para el desarrollo de la biotecnología en el país ni para la protección del consumidor. El desarrollo de la biotecnología en nuestro país ha quedado mermado por la falta de legislaciones claras, ausencia de implementación de leyes y la carencia de estudios relacionados a la biotecnología.

Por otra parte, el consumidor panameño no tiene posibilidad de elegir si llevar o no transgénicos a su mesa, pues el etiquetado de alimentos transgénicos aún no está especificado por ley. Además, no se les realiza un análisis a los productos importados para detectar si son transgénicos o no, ya que estos productos entran deliberadamente a nuestro país porque en Panamá no se cuenta con una institución que se dedique a realizar de forma rigurosa estos controles. Aunque los productos transgénicos han surgido como respuesta a las necesidades del hombre de mejorar por medio de la alteración genética de productos agrícolas algunas de sus características, existe, sin embargo, un debate mundial, si los organismos genéticamente modificados son o no inocuos para la alimentación del ser humano. La necesidad de información por parte de los consumidores, ha provocado que algunos países hayan tomado medidas informativas, tales como el etiquetado con respecto a los productos derivados de los OMGs para consumo tanto animal como humano, lo que requiere la aplicación de técnicas moleculares de detección que sean sensibles y específicas para identificar los transgénicos en alimentos.

Por esa razón esta investigación propuso detectar por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) la presencia de elementos transgénicos (gen bar, gen pat, prom 35S, genes cry1Ab y t-NOS) en alimentos. Se tomaron principalmente en cuenta aquellos productos importados de Argentina y Estados Unidos derivados de soya, maíz y arroz por ser estos los países que mayormente producen organismos genéticamente modificados.

1.3 Hipótesis: La detección por QRT-PCR de elementos transgénicos gen bar, gen pat, prom 35S y genes crys permitirá la identificación de OGM en alimentos.

1.4 Objetivos Generales y Específicos

1.4.1 Objetivo General

Detectar elementos transgénicos en alimentos mediante la reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (QRT-PCR).

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Aislar y cuantificar ADN a partir de alimentos tipo granos y procesados que contengan maíz, arroz y soya.
2. Identificar la presencia de elementos transgénicos como gen bar, gen pat, prom 35S y genes crys en alimentos utilizando la QRT-PCR.
3. Determinar las secuencias de las muestras que presenten elementos transgénicos.

1.5 Delimitación, Alcance o Cobertura.

Este proyecto de tesis contempló la implementación de metodología para detectar elementos transgénicos en granos y muestras procesadas que contengan maíz, arroz y soya. El trabajo de investigación forma parte de una de las líneas de investigación que ejecuta el Centro de que Investigación de Bioquímica y Química Aplicada (CIBQUIA).

1.6 Restricciones y/o Limitaciones

En Panamá no hay mucha información sobre el tema de los OGM, ya que no existe una legislación sobre los transgénicos en el país y son muy pocos los estudios realizados sobre el tema. Debido a múltiples factores, entre ellos a que existe una

falta de coordinación entre las instituciones gubernamentales que tienen que ver con la legislación y evaluación de la inocuidad de los alimentos transgénicos. La ausencia de coordinación puede deberse a que cada 5 años cambia el gobierno de turno y cambian hasta los nombres de las instituciones y las personas a cargo. Entonces no hay avances en el establecimiento de leyes y procedimientos para evaluar transgénicos. Por ello conseguir información sobre las leyes que se utilizan en el país para legislar el tema de transgénicos fue difícil. Aunado a esto está el hecho que en el país no existe un laboratorio de análisis certificado ni procedimientos nacionales establecidos y estandarizados para evaluar la inocuidad de los alimentos transgénicos que se importan en el país.

II. Marco Teórico

2.1 El ácido desoxirribonucleico (ADN)

Son macromoléculas formadas por desoxirribonucleótidos-5'-monofosfatos de: adenina, guanina, citosina y timina (nunca uracilo) que se unen entre sí mediante enlaces fosfodiéster 5' - 3' (**Figura 4**). Tienen un peso molecular muy elevado. En la mayoría de los casos es bicatenario, está formada por dos cadenas de nucleótidos, aunque en algunos virus es monocatenario. En algunos casos la molécula de ADN es circular (carece de extremos) como ocurre en las células procariotas, en algunos virus; en las células eucariotas es lineal (Becker, Kleinsmith, y Hardin,2007).

En las células eucariotas la mayor parte del ADN se localiza en el núcleo (ADN nuclear) formando la cromatina y los cromosomas, pero también hay una pequeña cantidad en las mitocondrias (ADN mitocondrial) y cloroplastos (ADN plastidial), este es similar al de las células procariotas (Alberts et al., 2013).

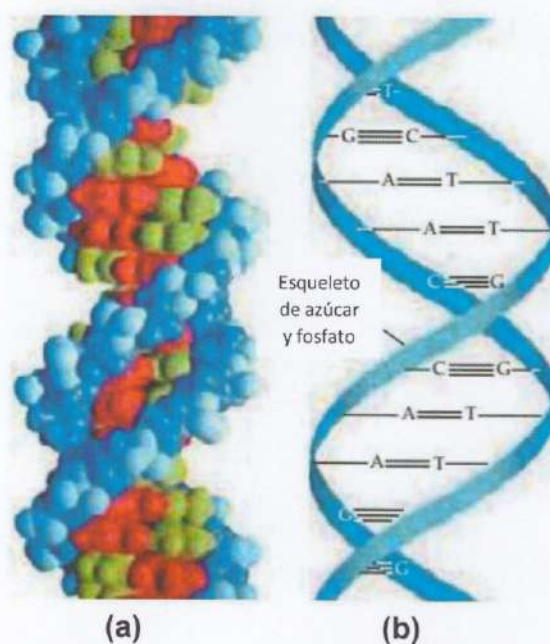


Figura 4. Estructura del ADN. (a) Modelo generado por computadora de una doble hélice de DNA. (b) Ilustración de la doble hélice, se observan las interacciones de puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarias. (Brown,2010).

Watson y Crick propusieron el modelo de doble hélice para el ADN, según la cual: La molécula de ADN está formada por dos cadenas de polidesoxirribonucleótidos, que son antiparalelas, es decir están orientadas en sentido opuesto, una tiene sentido 5' - 3' y la otra 3' - 5' (Alberts et al., 2013). La doble hélice se une mediante enlaces por puentes de hidrógeno que se establecen entre los grupos polares de las bases complementarias. Entre la adenina y la timina se forman 2, y entre la guanina y la citosina 3. Estas cadenas no son iguales, puesto que cada una de ellas está formada por bases complementarias (nucleótidos complementarios) de la otra, es por ello que se denominan cadenas complementarias. Las dos cadenas están enrolladas en espiral alrededor de un eje imaginario originando una doble hélice. Este enrollamiento es dextrógiro (hacia la derecha visto desde arriba) y plectonómico es decir esta enrollada una sobre la otra y para separarla es necesario hacerlas girar (Alberts et al., 2013).

2.2 Organismos genéticamente modificados (OGM)

Un OGM es un organismo ya sea vegetal, animal o microorganismo, en el cual se ha introducido un segmento de ácido nucleico que se incorpora de manera estable al genoma, de forma diseñada y que está dirigido a obtener un nuevo fenotipo (Corona y Martínez, 2007). Esta introducción es realizada de tal manera que dicho gen no podría haber sido adquirido por el organismo a través de mutaciones, recombinaciones u otras formas de transferencias genéticas reconocidas como mecanismos que operan en la naturaleza sin la intervención humana. Otra definición de organismos genéticamente modificados sería la dada según la Normativa Europea, la cual establece que un OMG se define como “el organismo, con excepción de los seres humanos, cuyo material genético ha sido modificado de una manera que no se produce naturalmente en el apareamiento ni en la recombinación natural” (UE,2001). Para la Food and Drugs Administration (FDA) un OGM (organismo genéticamente modificado) es una planta, animal o microorganismo al que se le ha cambiado su material genético (ADN) utilizando tecnología que generalmente implica la modificación específica del ADN, incluida la transferencia

de ADN específico de un organismo a otro (FDA, 2020a). Por otra parte, la FAO define a los organismos genéticamente modificados denominados también organismo vivo modificado (OVM) u organismo transgénico, a cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna (FAO, 2004). Desde este punto de vista, los OGM abarcan entonces a los transgénicos, cisgénicos, intragénicos y a los organismos que han sido fabricados con edición génica. Sin embargo, actualmente hay un debate si los organismos que han creados por edición génica entran o no en el concepto de OGM. En una cisgénesis, las construcciones de expresión contienen elementos genéticos completos de un grupo de genes sexualmente compatibles (Schouten et al., 2006). Mientras que un organismo intragénico es aquel OGM en donde el intragen introducido también se origina en la misma especie pero, son genes híbridos, que pueden tener elementos genéticos de diferentes genes y loci (Holme, Wendt, y Holm, 2013).

Por otra parte, los transgénico son OGM que contienen uno o más genes de cualquier organismo no vegetal, o de una planta donante que es sexualmente incompatible con la planta receptora. Esto incluye secuencias de genes de cualquier origen en la orientación antisentido, cualquier combinación artificial de una secuencia codificante y una secuencia reguladora, como un promotor de otro gen o un gen sintético (Jacobsen y Schouten, 2009). Otro término que actualmente se utiliza en biotecnología son los organismos vivos modificados (OVM), que corresponden a todos los organismos vivos que poseen una nueva combinación de material genético obtenido mediante el uso de biotecnología moderna y son un subconjunto de organismos modificados genéticamente (OMG). Las semillas, esquejes y cultivos de tejidos modificados genéticamente son partes vivas de las plantas y, por lo tanto, OVM (FAO,2008).

Hasta ahora, los productos obtenidos de las NPBT (Nuevas Técnicas de mejoramiento genético) se consideran organismos genéticamente modificados (OGM), de acuerdo con la norma 2001/18 de la Unión Europea, porque están incluidos entre las tecnologías de ADN recombinante (UE,2001).

2.3 Métodos para obtener un transgénico

La transgénesis involucra la inserción de piezas de ADN sintéticamente combinadas (constructo o transgén) dentro del genoma del organismo que va a ser modificado para dirigir la actividad del gen (Berdal y Holst-Jensen, 2001). Para crear un transgénico y que funcione correctamente, se tiene que introducir el transgen bajo el control de una secuencia específica del tejido en el que se quiere expresar la proteína (Zamora et al, 2011). Los sistemas para obtener transgénicos se clasifican en métodos indirectos y métodos directos, de acuerdo con el mecanismo utilizado para la transferencia del material genético hacia la célula vegetal.

2.3.1. Métodos indirectos: Son métodos basados en la utilización de vectores biológicos, empleando sus características naturales de patogenicidad en plantas, para la introducción de los genes de interés al genoma vegetal (Díaz y Chaparro, 2012). Entre ellos tenemos:

2.3.1.1. La bacteria *Agrobacterium tumefaciens*:

La transformación mediada por *Agrobacterium* se emplea comúnmente para transferir un gen extraño al genoma de las plantas (Sheng et. al, 2015). El mecanismo natural de infección de esta bacteria gran negativa del suelo es introducir un gen de su plásmido (fragmento de ADN circular y extracromosómico) en las células de la planta infectada. Este gen se integra en el genoma de la planta provocándole un tumor o agalla, en los cuales se encuentran células modificadas por la interacción, se aíslan estas células y a partir de ellas se genera el individuo transgénico (Campos, 2014). La extraordinaria capacidad de *Agrobacterium* para transferir su material genético a la célula huésped hace que evolucione de fitopatógeno a un poderoso vector transgénico y hay múltiples estudios que lo respaldan (Haddadi et al., 2015; Shen et al., 2015; Martins et al., 2015; Guoliang et al., 2018 ;Guo et al., 2019).

2.3.1.2 Vectores transposones

Los transposones (Tn) son secuencias de ADN presentes en los genomas de todos los seres vivos y tienen la propiedad de cambiar de un sitio a otro dentro del genoma. Existen varios tipos de transposones, según su estructura y su mecanismo de acción, los Tn pertenecen a: I) la familia de los ADN-ARN-ADN, que utilizan intermediarios de ARN para transponer secuencias ADN después de la transcripción reversa de su ARN a ADN se conocen como retrotransposones; y, II) la familia de los ADN-ADN, que directamente transponen ADN a ADN (Kidwell, 2005).

Sin embargo según su contenido se clasifican en transposón simple, secuencia de inserción o de cortar y pegar y transposón compuesto (Kidwell, 2005; Skipper et al., 2013). Cabe destacar que los vectores transposones se emplean mucho en la obtención de nuevas variedades de cultivos (Kobayashi et al., 2004; Benoit et al., 2019; Jiang et al., 2012; Lin et al., 2012)

2.3.2 Métodos directos

Debido a la dificultad de transformar monocotiledóneas por medio de *Agrobacterium*, se desarrollan sistemas de transferencia de genes, en los que se emplea procedimientos de naturaleza química, fisicoquímica y mecánica. El desarrollo de estos métodos, se basó en las técnicas físicas usadas en la transformación de células animales en cultivo (Díaz y Chaparro, 2012). Entre las principales usadas para cultivos transgénicos tenemos:

2.3.2.1 La biobalística

Es el método más difundido para obtener un organismo transgénico y consiste en bombardear las células con partículas metálicas microscópicas recubiertas del DNA que se desea introducir. Si bien esta técnica ha dado buenos resultados, tiene un componente aleatorio de efecto muy fuerte que da un amplio margen a resultados impredecibles y un incremento significativo en la tasa de mutación celular (Campos,

2014). Para ello se utilizan microproyectiles o nanoproyectiles de oro o tungsteno (inertes químicamente) disparados a velocidad supersónica por liberación de He o N₂ a gran presión, éstos atraviesan la membrana sin causar daños a la célula (O'Brien y Lummis, 2011). Adicionalmente, esta técnica es considerada entre las estrategias que permiten transformar organelos celulares como mitocondrias y cloroplastos de modo reproducible (Vaca et al., 2015).

2.3.2.2 Electroporación

La electroporación es una técnica que permite el ingreso de ADN a la célula blanco por medio de poros transitorios en membranas celulares. Con esta metodología, se busca permeabilizar las membranas, mediante el aumento significativo de la conductividad eléctrica, causado por un campo eléctrico aplicado externamente (Díaz y Chaparro, 2012).

Estos poros son generados tras la aplicación de pulsos unipolares cortos, ocasionando una alteración electroquímica en la bicapa lipídica de la membrana celular (Yarmush et al., 2014). Esta técnica se puede aplicar con otras como la nueva técnica de edición génica CRISPR Cas9, para lograr un mejor resultado en los organismos generados con las características deseadas (Wang et al., 2016).

2.3.2.3 Sonicación

Es un método utilizado en la transferencia de genes para la transformación de tejidos vegetales, células intactas y protoplastos. Se emplea ultrasonido con frecuencias superiores a 20 KHz, para generar permeabilidad en las membranas, mediante la inducción de poros transitorios, a través de los cuales, el DNA foráneo puede ingresar al interior de la célula vegetal (Díaz y Chaparro, 2012).

La sonicación o sonoporación es un método de transferencia génica muy versátil que permite introducir DNA exógeno desde protoplastos a células en suspensión y tejidos. El único problema o desventaja, es que las ondas ultrasónicas pueden

causar daño a células a causa de la elevada temperatura que produce, lo que limitan el uso de esta técnica (Díaz y Chaparro, 2012). Cabe resaltar que esta tecnología no sólo se está empleando para obtener transgénicos, ya que, se están realizando estudios en los cuales se diseñan sistemas de transporte dirigido de fármacos cuya liberación se induce mediante ultrasonidos (Chai et al., 2014; Phenix et al., 2014).

2.3.2.4 La microinyección

La microinyección utiliza microcapilares o microagujas de vidrio y sistemas de microscopia para depositar el ADN foráneo, en el interior de células vegetales (Díaz y Chaparro, 2012). La microinyección utiliza células inmovilizadas para internalizar el ADN directamente al inyectarlo a cada célula blanco de manera individual (Gutiérrez et al., 2003).

2.3.2.5 Microláser

También es conocida como optoporación o fototransfección. El objetivo de esta metodología es la permeabilización de las membranas, que se lleva a cabo mediante la utilización de un chorro de microláser enfocado en el sistema de iluminación de un microscopio, permitiendo así abrir orificios o poros transitorios en la pared celular y en la membrana plasmática de las células vegetales, que se desean transformar para permitir la entrada al ADN foráneos debido a la diferencia osmótica entre el medio y el citosol (Díaz y Chaparro, 2012; Artola et al., 2017).

2.3.2.6 La transformación de protoplastos

Es una técnica que permite la transformación genética de una célula vegetal suprimiendo la pared celular, utilizando enzimas o por procedimientos mecánicos, para luego por electroporación, microinyección o concentraciones de sales insertar el ADN exógeno (Vela, 2013).

2.3.2.7 Transferencia mediada por sustancias químicas

Se basa en el uso de compuestos químicos que induzcan permeabilidad en la membrana. Entre los compuestos químicos que más se han utilizado para este propósito tenemos: Polietilenglicol (PEG), Fotostato de calcio y Poly-L-omotina. Estas sustancias ayudan a inducir permeabilidad en las membranas, mediante la inducción de poros transitorios o daño reversible de la membrana, lo que permite o favorece el paso del DNA foráneo y de macromoléculas, a través de la membrana hacia el interior de la célula (Díaz y Chaparro, 2012).

También se han desarrollado investigaciones en nanomateriales para utilizarlos como vehículos de ADN y lograr una transferencia génica exitosa, usando fullerenos, nanotubos de carbono, entre otros (de Mello Brandão et al., 2016; Castro et al., 2017).

2.3.3 Nuevas técnicas de fitomejoramiento o NPBT

Producto de los avances de la investigación genómica de los últimos años, se han desarrollado o ajustado, un conjunto de técnicas nuevas, también conocidas como NPBT “nuevas técnicas de fitomejoramiento” o “New Breeding Techniques” incluyen a las técnicas de edición de genomas, o bioingeniería de precisión y permiten establecer cambios dirigidos, predecibles, planeados y permanentes en sitios específicos del genoma de células vivas y organismos, en particular cultivos (Salonia et al., 2020). Todas las técnicas NPBT tienen una característica en común: los productos finales obtenidos (plantas o ciertas partes de ellas) no presentan genes foráneos o distintos a los de la especie utilizada. Por esta razón, son consideradas en algunos países como exentas de tener que pasar por el sistema minucioso de bioseguridad que se aplica a un OGM común (Hartung y Schiemann, 2014). Sin embargo, el Tribunal de Justicia de las Comunidades Europeas ha dictaminado que los cultivos modificados por mutagénesis dirigida entran dentro del ámbito de aplicación de la norma 2001/18 / y se regulan con dicha norma al igual

que los otros OGM, lo que ha creado una polémica mundial al respecto (Chhalliyil et al.,2020).

Dentro de las NPBT se incluyen: la tecnología de nucleasa dirigidas a sitios específicos (TALEN,meganucleasasCRISP/Cas-9,dedos de Zinc), mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, cisgénesis e intragénesis, metilación de ADN dependiente de ARN, injerto en portainjerto genéticamente modificado, reproducción o hibridación inversa y la agroinfiltración (Lusser et al., 2011).

2.4 Construcción de un transgén o inserto

La transgénesis se define como la introducción de ADN exógeno, en una célula eucarionte (Legorreta et al., 2012). El fragmento de ADN introducido en un vector de clonación y que se coloca en el genoma del nuevo organismo se llama inserto o constructo (FAO, 2004).

El constructo está constituido por un promotor que favorece la expresión del gen insertado, un transgen que confiere la característica nueva al organismo huésped, un gen marcador que favorece la selección de las especies transformadas y un terminador que facilita la detención de la transcripción (**Figura 5**) (Guerrero et al.,2018).

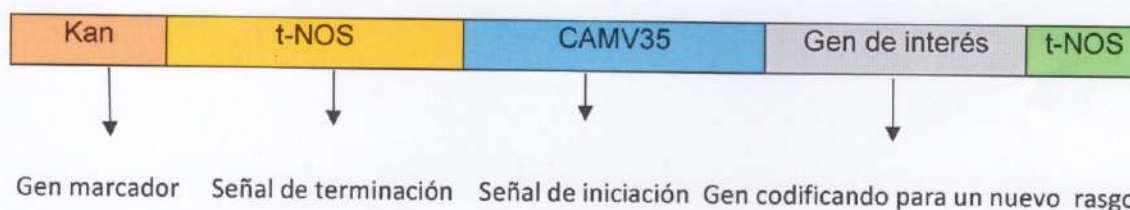


Figura 5. Constructo del gen (producción propia).

2.4.1 El promotor

Es una secuencia de ADN situada en el extremo 5' cuya función es regular la transcripción del gen insertado. El elemento promotor que funciona como un

interruptor (enciende/ apaga) del gene insertado o alterado (Haruyama, Cho, y Kulkarni, 2009).

Los promotores según la función, tipo y nivel de expresión genética observada, se clasifican en: constitutivos, tejido-específicos o estadio-específicos, inducibles y sintéticos (Peremarti et al, 2010; De Guglielmo y Fernandez 2016). En el caso de los promotores constitutivos son aquellos que están activos en la mayoría de los tejidos y etapas del desarrollo de la planta (Vaca et.al,2019). Un promotor de importancia histórica en transformación genética en plantas, es el promotor del virus del mosaico de la coliflor CaMV35S, que ha sido ampliamente utilizado desde la década de los 80s, por su alta actividad promotora constitutiva tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas y generalmente confiere altos niveles de expresión génica (Radonic, 2011).

2.4.2 La región codificante

Es la secuencia genética que se transcribe para sintetizar la proteína transgénica (FAO, 2004). Para lograr obtener el rasgo deseado en la planta transgénica, no solo es necesario utilizar el método de transformación óptimo, sino que es preciso definir qué tipo de secuencia de interés es la óptima, y cómo su expresión será regulada dependiendo del promotor y terminador elegidos. A continuación, se describirán los genes que se buscaban en esta investigación.

2.4.2.1 El gen cry y las proteínas que codifica

Las proteínas Cry son las más utilizadas para el manejo y control de insectos plaga. Las plantas transgénicas han sido utilizadas para reducir las pérdidas que ocasiona el ataque de dichos insectos (Verdugo et al.,2019). El mecanismo de acción de las proteínas Cry se describe como un proceso de varias etapas. Primero, los cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Luego son procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas,

que atraviesan la membrana peritrófica y se unen de forma univalente a la caderina. La unión de los monómeros a caderina facilita el clivaje proteolítico sobre el extremo N-terminal de la toxina y se forma un poro en el epitelio del intestino medio por ende el tejido intestinal resulta dañado gravemente, lo que impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva y este proceso desencadena la muerte del insecto (Sauka y Benintende, 2008).

Recientemente se ha reportado la existencia de una nueva clase de proteínas Cry inocuas contra insectos que son conocidas como paraesporinas y que presentan actividad citotóxica a ciertos tipos de células cancerígenas del humano (Velásquez et al., 2018).

2.4.2.2 Los genes *pat*, *bar* y las proteínas que codifican

El gen *bar* (por "bialaphos resistance gene") fue clonado de *Streptomyces hygroscopicus* y está involucrado en la biosíntesis de bialaphos (Da Silva y Yuffá, 2004). El *Bialaphos* es un antibiótico tripéptido producido por *Streptomyces hygroscopicus*. Y consiste de L-PPT (también conocido como glufosinato de amonio), un análogo del ácido L-glutámico, y dos residuos de L-alanina. La PPT es un potente inhibidor de la glutamina sintetasa (GS) porque remueve estos residuos por peptidasas. La enzima GS tiene un papel esencial en la asimilación de amonio y en el metabolismo del nitrógeno en las plantas. Esta es la única enzima en las plantas que puede destoxificar el amonio liberado por la reducción de nitrato, la degradación de aminoácidos y la fotorespiración. La inhibición de la GS por PPT causa una acumulación rápida de amonio que lleva a la muerte de las células de la planta (Da Silva y Yuffá, 2004). Las especies productoras de bialafos *Streptomyces hygroscopicus* y *Streptomyces viridochromogenes* están protegidas de la toxicidad por PPT por la fosfinotricina acetiltransferasa (PAT). PAT está codificado por los genes *bar* (resistencia a bialafos) o *pat* (fosfinotricina acetiltransferasa, y desintoxica el PPT por acetilación. Las enzimas PAT codificadas por estos dos genes son funcionalmente idénticas y muestran un 85% de identidad a nivel de aminoácidos (Lutz et al., 2001).

2.4.3 Terminador

Es una secuencia de ADN que señala el final de la transcripción (FAO, 2004). En plantas transgénicas el terminador más empleado es el t-NOS del gen nopalina sintasa de *A. tumefaciens*. El OMG resultante de la integración estable de la construcción transgénica en el genoma se conoce como “evento” de transformación (FAO,2004).

2.5 Métodos para determinar OGM en alimentos

Existen distintos métodos que permiten detectar de manera cualitativa y cuantitativa la presencia de genes y proteínas transgénicas en los diferentes cultivos GM. Estos métodos pueden estar basados en la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) conferido o la detección inmunológica de la proteína que codifican (Verdugo et al.,2019). Para aplicar técnicas de identificación de OGM, ya sea basadas en proteínas o ADN se requieren considerar algunos aspectos como: la preparación de las muestras, los efectos de la matriz de los alimentos sobre la extracción de proteínas o ADN y ciertos parámetros de trabajo, por ejemplo, materiales de referencia, validación de la técnica, armonización de normas, así como la accesibilidad a la recopilación de información organizada (Salisu et al.,2017).

La complejidad de la estrategia empleada para la identificación de los OGM varía de acuerdo con el tipo de modificación a estudiar, pasando del uso de métodos simples para el estudio de modificaciones individuales al uso de combinaciones de métodos para el análisis de eventos múltiples (Guerrero et al.,2018). El análisis para la detección de OGM se basa en diferenciar una variedad modificada genéticamente de una no modificada, de manera directa en el cual se busca evidenciar la presencia directa del material genético insertado o indirecta cuando se busca identificar las proteínas resultantes de la modificación genética (Anklam et al., 2002).

2.5.1 Detección basada en expresión proteica

Los métodos de detección basados en proteínas comprenden las diferentes tecnologías de inmunoensayos con anticuerpos mono o policlonales y varían según la especificidad del sistema de detección, la aplicación particular y el costo; y poseen límites de detección entre el 0.25% - 1% (Guerrero et al.,2018).

La detección basada en expresión proteica es utilizada en plantas, porque la cuantificación en tiempo y espacio de las proteínas que se confieren a un cultivo genéticamente modificado forma parte de su caracterización para generar información requerida en los diferentes análisis previos a su comercialización. Por ejemplo, los niveles de expresión de la proteína conferida en las diferentes partes de las plantas, es utilizada como información base del análisis de riesgo ambiental y los datos de la concentración de la proteína conferida al GM en el grano cosechado es utilizado en el análisis de exposición dietaria (Verdugo et al.,2019).Entre los ensayos inmunológicos disponibles para la identificación y cuantificación de especies basadas en proteínas o péptidos más utilizadas se encuentran: ELISA, tiras de flujo lateral y Western Blot, Los dos primeros son los más utilizados para la detección de proteínas por su bajo costo, facilidad y los escasos requerimientos para el manejo de la muestra (Guerrero et al.,2018).

La técnica de ensayo de inmunodetección ligado a enzima (ELISA), se basa en el uso de anticuerpos o antígenos específicos marcados con una enzima para la detección de la proteína de interés presente en la muestra de análisis. En el caso particular de la detección de los OGMs, el antígeno es la nueva proteína expresada producto del nuevo gen introducido (Núñez, 2011). A pesar de ser un método barato y rápido, presenta limitaciones importantes: es menos específico que los métodos basados en ADN (Montori, 2006). El límite de detección de los inmunoensayos es aproximadamente 1% así que no son muy sensibles. Además, existe la probabilidad de falsos negativos, especialmente en alimentos procesados, puesto que el método solamente detecta proteínas y estas pueden degradarse en el procesamiento de la muestra, limitando el uso de estos métodos (Guerrero et al.,2018).

2.5.2 Detección basada en el análisis de ácidos nucleicos

Los métodos basados en ADN son más específicos y sensibles además son los métodos aceptados y validados por las instancias reguladoras internacionales (Gasparic et al., 2010).

2.5.2.1 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction o PCR) es una técnica que ha revolucionado el trabajo en Biología Molecular. Fue desarrollada a mediados de los años ochenta por Kary Mullis, quien obtuvo por ello el Premio Nobel (Cárdenas, 2011).

El Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Alimentos y Piensos Modificados Genéticamente (EU-RL GMFF) y el Centro Común de Investigación (JRC) de la Comisión Europea, han validado 118 métodos de detección e identificación de eventos OGM basados en PCR. Todos éstos métodos han sido validados mediante ensayos de colaboración de acuerdo a los principios y recomendaciones de las normas estándares ISO 5725 e ISO 1725 (Angers et al., 2014). De acuerdo con la secuencia de interés los ensayos basados en PCR se pueden clasificar en diferentes niveles de especificidad en tamizaje o cribado elemento-específico, constructo-específico y evento-específico (Guerrero et al., 2018):

-Elemento específico

El primer nivel de detección tiene por objeto determinar si la muestra que se está analizando tiene o no la presencia de modificaciones genéticas. Este nivel se denomina screening o cribado. Para este caso, las dianas o secuencias de interés son los rasgos comunes más frecuentemente utilizados para realizar modificaciones genéticas o en algunos casos constructos específicos que son comunes a algunos eventos de transformación genética (Vela, 2013).

-Constructo específico

El segundo nivel es la detección constructo específica y consiste en determinar la presencia de un tipo de constructo específico que es común para algunas modificaciones genéticas (Querci et al., 2007). Es decir, en el nivel constructo específico se busca identificar regiones constituidas por la unión de un elemento regulador y un transgen. Para esta detección, el amplicón inicia en el promotor, enhancer o intrón o terminador del constructo y termina en la secuencia de interés. El ejemplo más claro de esta detección es la técnica por p35S: bar, la cual es altamente utilizada para identificar especies genéticamente modificadas en arroz (Holst-Jensen et al., 2012).

-Evento específico.

El evento-especifico reconoce una secuencia correspondiente a la unión del genoma del huésped con el elemento insertado, este último, constituye la base para la asignación de un identificador único para cada OGM (Guerrero et al.,2018).

En la **Figura 6** se pueden observar los niveles de detección e identificación por PCR en grado creciente de especificidad, las flechas horizontales indican la ubicación de los cebadores.

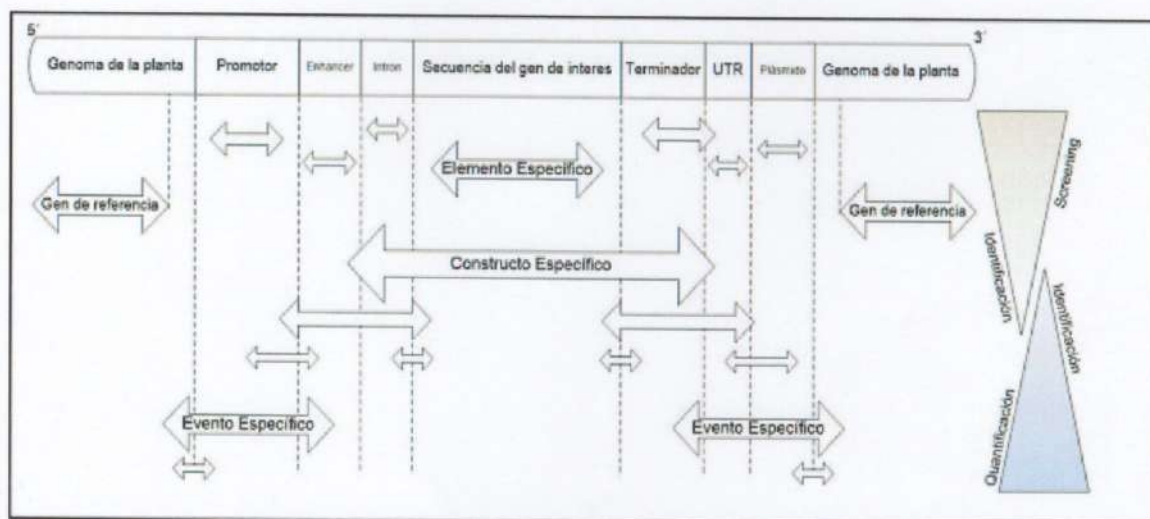


Figura 6. Representación de un evento transgénico tipo y los cuatro niveles para el análisis de OGM en alimentos (Guerrero et al.,2018)

El cuarto nivel de detección es la cuantificación. El objetivo de la cuantificación, es definir la cantidad de la secuencia evento específica presente en una muestra, su propósito principal es determinar el contenido porcentual de OGM en el alimento, para evaluar si requiere o no el etiquetado (Markoulatos et al.,2004). Esta cuantificación se realiza utilizando la amplificación del transgen frente a la amplificación del gen de referencia (Querci et al., 2010).

2.5.2.1.1 Etapas de una PCR convencional

La PCR utiliza ciclos de temperatura para iniciar y finalizar síntesis de ADN catalizada por la enzima polimerasa. Cada ciclo consta de tres etapas (ver **Figura 7**).

- **Desnaturalización**

En esta etapa, las cadenas de ADN desnaturalizadas, es decir son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; sin embargo, el tiempo dependerá de la secuencia del templado; si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo y de dependerá de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo (Tamay de Dios et al.,2013).

- **Hibridación**

La hibridación implica el reconocimiento de dos partidores de oligonucleótidos sintéticos con el ADN molde desnaturalizado. Es la etapa en la que los partidores se alinean al extremo 3' del templado previamente separado. Los partidores, generalmente son de 20 a 25 nucleótidos de longitud y se diseñan utilizando conocimientos preexistentes de la secuencia de ADN molde. Los dos partidores son complementarios a las secuencias opuestas hebras del ADN diana (Green y Sambrook, 2019).

- **Extensión** En esta etapa se inicia la síntesis de ADN en los extremos 3' de los partidores unidos. La amplificación de los cebadores ocurre a temperaturas entre 55 °C y 70 ° C en una reacción enzimática catalizada por la ADN polimerasa termoestable. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3' y la temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima taq trabaja óptimamente (Tamay de Dios et al.,2013). Este proceso, que se repite entre 25 y 35 veces, tiene lugar en un termociclador, un dispositivo programable que controla el tiempo y la temperatura de cada paso del ciclo (Green y Sambrook,2019).

En la **Figura 7** se muestran los pasos involucrados en una PCR convencional. La plantilla original (arriba) es ADN bicatenario, y los partidores hacia la izquierda y hacia la derecha representan las flechas horizontales (Green y Sambrook, 2019).

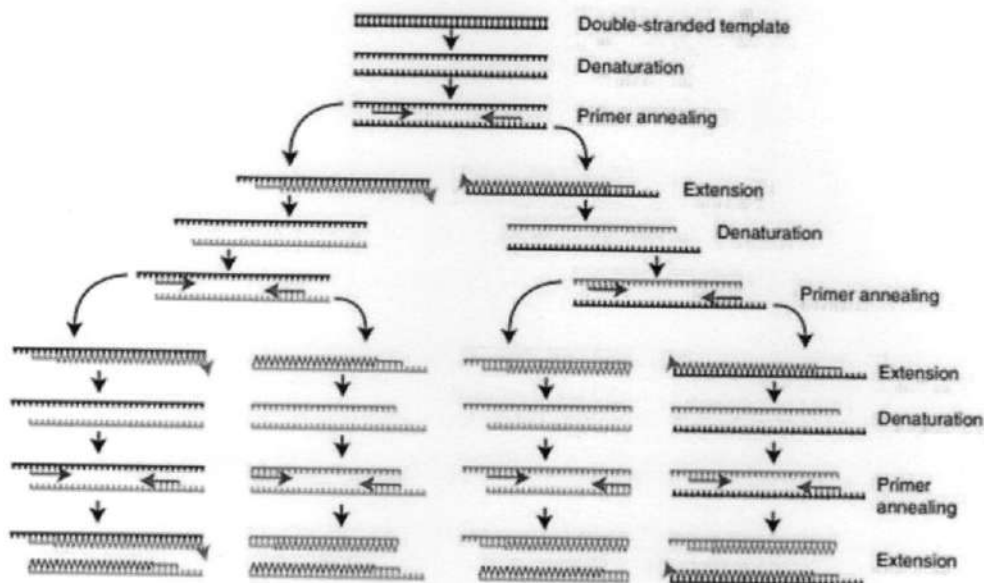


Figura 7. Etapas de la PCR (Green y Sambrook, 2019).

2.5.2.1.2 Insumos necesarios para la PCR

-ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa)

Esta enzima es necesaria para catalizar la síntesis de ADN. Existe una amplia variedad de enzimas disponibles, que varían en su fidelidad, eficiencia y capacidad para sintetizar productos de ADN de gran tamaño. Para los análisis de PCR generalmente se utilizan, de 0,5 a 2,5 unidades por reacción estándar de 25 a 50 μL . Originalmente fue aislada de *Thermus aquaticus*, (bacteria termófila que vive en la proximidad de manantiales de agua caliente) (Green y Sambrook et al.,2019). El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, por lo que se le considera una enzima termoestable (Tamay de Dios et al.,2013).

-Partidores

De los muchos factores que influyen en la eficiencia y especificidad de la reacción de amplificación, ninguna es más crucial que el diseño del partidor (Green y Sambrook et al.,2019).

Al diseñar los partidores deben cumplir con ciertas características como son 15-25 pares de bases, la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia, si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de partidor o estructuras de horquillas, es decir, de productos inespecíficos

(Tamay de Dios et al.,2013).

-Trifosfatos de desoxinucleósido (dNTP)

Los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas dATP, dTTP, dCTP y dGTP, con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN (Tamay de Dios et al.,2013).

-Buffer

La función de la solución tampón es mantener el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa (Bolívar et al.,2014).

-Iones divalentes y monovalentes

Los iones divalentes como el magnesio actúan como cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción (Tamay de Dios et al.,2013).

-ADN molde

Contiene la región de ADN que se va a amplificar (Bolívar et al.,2014).

-Agua

El agua es utilizada como disolvente, se requiere que al menos sea desionizada o mili-Q grado molecular (Bolívar et al.,2014).

2.5.2.2 PCR en tiempo real (qRT-PCR o qPCR)

Los primeros desarrollos de la PCR tiempo real se realizaron por Higuchi y colaboradores entre 1992 y 1993, basados en el principio de la fluorescencia del Bromuro de Etidio cuando se intercala con las moléculas de ADN (Vela, 2013). Por ser una variante de la PCR convencional, la PCR en tiempo real (qPCR o qRT-PCR) se basa en el mismo método desarrollado por Kary Mullis, y por tanto posee los mismos pasos que la técnica en PCR convencional, es decir desnaturalización, hibridación y extensión (Valasek y Repa, 2005). Sin embargo, la diferencia básica entre la PCR convencional y la PCR en tiempo real es que esta última utiliza moléculas informadoras fluorescentes como el SYBR Green o sondas específicas como la Taqman, para controlar la producción de productos de amplificación durante cada ciclo de reacción (Bustin, 2005).

En general, estos sistemas pueden ser clasificados en dos métodos diferentes: específicos (SYBR Green) y no específicos (Sondas) (Tamay de Dios et al.,2013). Para realizar un análisis de rutina de OGM usando esta técnica (independientemente si se utiliza SYBR Green o sondas Taqman), normalmente se siguen tres pasos principales: Primero se realiza un cribado con elementos comunes que se encuentran en los OGM, como p35S (Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor) y tNOS (terminador de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*).

Además, se deben usar algunos marcadores discriminativos, como Cry3Bb, gat-tpinII y t35S pCAMBIA, y taxón específico. Luego se identifican eventos GM utilizando marcadores específicos de constructo o de eventos específicos dirigidos y finalmente, se determina la cantidad de eventos GM identificados presentes en la muestra. Este paso de cuantificación se lleva a cabo sobre la base del número de copias pertenecientes al transgén y al endógeno (Fraiture et al.,2015).

Existen dos métodos diferentes para presentar la expresión genética cuantitativa: cuantificación absoluta y la relativa. La cuantificación absoluta calcula el número de copias del gen normalmente relacionando la señal de PCR con una curva estándar. La expresión genética relativa presenta los datos del gen de interés en relación con algún calibrador o gen de control interno (método Ct comparativo) (Schmittegen y Livak, 2008).

2.5.2.2.1 PCR en tiempo real utilizando SYBR Green

En esta técnica se utiliza un agente intercalante o fluoróforo (SYBR Green), se basa en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del ADN diana (Bustin, 2005).

El SYBR Green se utiliza en PCR en tiempo real para monitorear la cinética de la amplificación. Es una molécula con una afinidad por el ADN de doble hebra, cargada positivamente mientras está en solución sin unirse al ADN de doble cadena prácticamente no emite fluorescencia, sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN se incrementa hasta 1,000 veces su fluorescencia (Debode et al.,2017; Tamay de Dios et al.,2013). Este método inespecífico se basa en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR (Aguilera et al.,2014).

En la **Figura 8** se puede observar que el colorante SYBR Green se une al surco del ADN bicatenario, pero no al ADN monocatenario, igualmente se observa que la

fluorescencia de este tinte aumenta 100-a 200 veces cuando se une al surco menor del ADN de doble hebra.

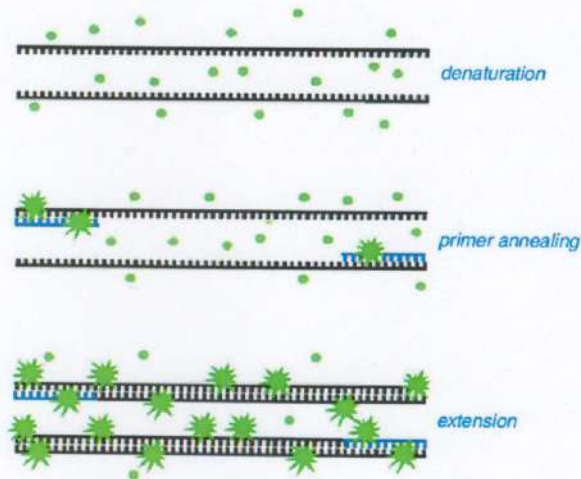


Figura 8. Detección de productos de amplificación mediante SYBR Green (Fraga, Meulia, Fenster,2014).

Este sistema es muy económico y permite el empleo de un solo fluoróforo en diferentes ensayos, sin embargo presenta varias desventajas ya que no es posible hacer reacciones múltiples o multiplex (donde se amplifican varios genes en la misma reacción) (Aguilera et al.,2014; Van Guilder et al.,2008) .Además la señal no es específica, porque el fluoróforo se une a cualquier amplicón de ADN y puede generar señales falsas positivas si en el ensayo están presentes productos no específicos o dímeros de cebadores (Arikawa, Sun, Wang,et al.,2008). Muchos laboratorios, para evitar esta situación, optimizan sus reacciones realizando una «curva melting» o «curva de disociación» al final de la reacción, cuya función es la de evaluar si se formó un producto único o si hay presencia de dímeros de partidores (Tamay de Dios et al.,2013).Una característica importante de la unión SYBR Green al ADN es que en la PCR, la proporción del tinte entre las bases no es constante, ya que cambia con el número de ciclos a medida que se produce más ADN bicatenario. En consecuencia, el análisis de la curva de fusión puede verse influido

por el número de ciclos y la cantidad de ADN presente después de la amplificación (Bustin y Huggett, 2017). Aunque el SYBR Green exhibe una señal fluorescente muy fuerte, se ha demostrado que inhibe la reacción de PCR y tiene un rango dinámico estrecho y menor reproducibilidad que otras sustancias químicas usadas en detección (Eischeid, et al.,2011).

2.5.2.2.2 Análisis de la curva de fusión o High Resolution Melt (HRM)

La curva de disociación es la representación gráfica del proceso experimental de amplificación por PCR-tiempo real, en la etapa en la que se aumenta la temperatura del sistema de reacción para que todas las cadenas de ADN que se encuentren en doble cadena se disocien a cadenas simples y de esta forma, las moléculas de SYBR Green que se encontraban unidas al ADN de doble cadena se liberan lo que se observa como una disminución de la fluorescencia (Flores et al.,2007).

La curva de fusión mide la disociación del ADN en función de la temperatura. Basándose en esta temperatura de fusión, es posible discriminar los fragmentos inespecíficos de los productos de PCR específicos (Broeders et al., 2012).

La temperatura de fusión de las moléculas de ADN de doble cadena está influenciada por varios factores, como la longitud, el contenido de GC y su composición, lo que permite distinguir entre moléculas con diferentes secuencias (Heredia et al.,2020).

2.5.2.3 Nuevas técnicas para detección de OGM

2.5.2.3.1 Multiplex PCR

La tecnología de PCR multiplex se basa en la tecnología de qPCR, sin embargo, en esta técnica se utilizan varios genes dirigidos al mismo tiempo (Liu y Yin,2020). La qPCR multiplex requiere el uso de ensayos basados en sondas, en los que cada sonda se marca con un tinte fluorescente único, lo que da como resultado diferentes colores observados para cada ensayo. La señal de cada tinte se usa para cuantificar

la cantidad de cada objetivo por separado en el mismo pocillo (Hawkins y Guest, 2017). Presenta la ventaja de disminuir el número de reacciones necesarias para probar la presencia potencial de OMG en una muestra, ya que en este método varias dianas de ADN se pueden detectar en una sola reacción (Hawkins y Guest ,2017). Comparado con la PCR tradicional, la credibilidad de sus resultados es mayor, ya que no solo puede reducir el tiempo de prueba y los costos, sino que también mejora la eficiencia de detección (Liu y Yin,2020). Además, presenta la ventaja de disminuir el número de reacciones necesarias para probar la presencia potencial de OMG en una muestra, ya que en este método varias dianas de ADN se pueden detectar en una sola reacción (Hawkins y Guest ,2017). Por ejemplo, en un estudio se detectaron simultáneamente cinco genes de forma específica en aceite de soya transgénico (Liu y Yin,2020). Actualmente esta técnica se utiliza para detectar secuencias transgénicas en alimentos, en diferentes matrices complejas que van desde tomates, soya y alimentos procesados como el aceite entre otros (Azizi, Sharifan, Emtiazjoo,2020; Liu y Yin,2020; Xu et al.,2020).

2.5.2.3.2 Biosensores de ADN

Los biosensores son sensores químicos en los que el sistema de reconocimiento utiliza un mecanismo bioquímico. Un biosensor de ADN es el aquel que tiene un sistema de reconocimiento y que involucra ácidos nucleicos como receptores y la reacción de hibridación como evento de reconocimiento (Manzanares,2018). Se utilizan varios métodos electroquímicos para la detección de OMG, incluidos espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), voltamperometría cíclica (CV), onda cuadrada voltamperometría (SWV) y decapado anódico voltamperometría (ASV) (Mousavian et al.,2018). Actualmente los biosensores se utilizan para detectar elementos transgénicos como el T-NOS y el P35S en soya (Alipour, et al., 2020; Deng et al.,2020 ;Li et al., 2020;). También se ha descrito su utilidad para determinar eventos transgénicos del maíz en donde destacó su aplicabilidad para integrarse en un dispositivo portátil para monitorear el evento MIR162 de maíz (Liu

F et al.,2020). Además, se ha empleado para detectar alimentos modificados por edición genética (Wu et al.,2020).

2.5.2.3.3 Secuenciación de próxima generación (NGS)

Con este método es posible cubrir una gran cantidad de eventos genéticamente modificados, ya que la base de datos incluye las secuencias de los elementos estructurales más utilizados en plantas genéticamente modificadas y esto hace posible reconstruir parcial o completamente la nueva secuencia insertada en el genoma de la planta incluso con porcentajes bajos de OGM (Debode et al.,2019)

Actualmente esta técnica se emplea para determinar OGM sin el conocimiento previo del cassette o secuencia genéticamente modificada, muy aplicable para detectar OGM desconocidos o no autorizados (Duan et al.,2020). Los métodos de secuenciación también son adecuados para detectar modificaciones del ADN, como la variante de un solo nucleótido (SNV), que es la clase de ediciones del genoma más difícil de detectar y que ocurren típicamente en plantas con genoma editado (Ribarits et al.,2021).

2.5.2.3.4 Microarreglos

Los microarreglos son un conjunto de sondas dispuestas por puntos, enlazadas a un soporte sólido en una disposición regular fija, donde cada punto contiene varias copias de la misma sonda. Luego el microarreglo se hibrida con el ADN aislado de la muestra de interés, el cual previamente ha sido marcado (Guerrero et al., 2018). En los microarreglos los objetivos de transgénicos se amplifican mediante PCR, utilizando cebadores universales y / o específicos del objetivo, antes de ser hibridado en la matriz, permitiendo la detección simultánea de más de 250000 dianas en un ensayo, comparado con qPCR, el microarray presenta, por tanto, un rendimiento muy superior, pero una sensibilidad menor (Fraiture et al.,2015).

2.5.2.3.5 PCR digital (dPCR)

Es una versión de la técnica de PCR, se basa en diluir y dividir la muestra en pequeñas porciones denominadas particiones, a tal punto que cada reacción se realiza sobre una única molécula de ADN contenida en una partición (Guerrero et al.,2018). La distribución de las secuencias objetivo en las particiones se puede aproximar con una distribución de Poisson. Cada partición actúa como un microrreactor de PCR individual y las particiones que contienen secuencias diana amplificadas se detectan por fluorescencia (Quan et al.,2018). La división de los volúmenes de reacción en particiones se logra utilizando pozos en un chip en dPCR basado en microfluidos / chip (cdPCR) o gotas en dPCR basado en emulsión / gotitas (ddPCR). Este enfoque permite la cuantificación sin necesidad de curvas estándar (Košir et al.,2019).

Diversos estudios confirman que la PCR digital es un método actualmente utilizado para determinar secuencias y eventos transgénicos con mucha precisión (Košir et al.,2019; Liu J et al.,2020). Además, ha demostrado ser una técnica útil para determinar alimentos editados genéticamente, ya que en un estudio del 2020 de Peng et al, se encontró que en comparación con los métodos basados en qPCR y NGS, el método dPCR tiene un límite inferior de detección (LOD) de la frecuencia de edición y una mejor relación con la frecuencia de edición esperada para detectar la región editada de muestras de arroz editadas genéticamente.

2.6 Argumentos a favor y en contra de los OGM

Es indudable que las plantas transgénicas son mucho más resistentes a las inclemencias del tiempo, a los insectos y plagas que muchas veces merman la producción de diversos cultivos (Raina y Khan,2020).

La posibilidad de crear alimentos susceptibles de crecer en las condiciones más adversas o mejorar su contenido nutricional, puede contribuir a paliar el hambre en un mundo (Martín,2017). En este sentido diversos estudios se están llevando a cabo con el fin de producir alimentos transgénicos con mayor valor nutricional. Por ello

se ha venido desarrollando una nueva variedad de arroz transgénico que no sólo ha aumentado los niveles de hierro y zinc en los granos, sino que también produce 10 veces más betacaroteno (precursor de la vitamina A) respecto al nivel previamente logrado con el famoso “arroz dorado” (Singh, GUISSEM y BHULLAR, 2017). También existe evidencia que el trigo transgénico contiene mayor cantidad de hierro y zinc, lo que podría utilizarse para contrarrestar la deficiencia de estos elementos (AKHTAR, et al., 2020). Por otra parte, se está evaluando mejorar nutricionalmente la papa convencional a través de la modificación genética (UPADHYAYA y BAGRI, 2021). Otro argumento a favor de los transgénicos es el hecho de que puedan ser utilizados como fábricas de medicinas. De hecho, la tercera generación de los transgénicos tiene por objetivo la producción de medicamentos, empleando a las plantas como fábricas. El primer fármaco producido por medio de la tecnología del ADN recombinante fue la insulina, en 1982, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó su uso (ALVARADO et al., 2019). Dicho fármaco fue denominado Humulin®, el cual es una insulina basal de efecto prolongado/intermedio para pacientes diabéticos.

Aunque cada día son más las aplicaciones de los transgénicos tanto en cultivos como en la producción de medicinas, es un hecho que aún despierta controversias en cuanto a su inocuidad y posibles efectos en la salud humana y el ambiente. Actualmente existen muchos artículos que apoyan la inocuidad de los alimentos transgénicos en animales y en algunos casos se afirma que no hay diferencias significativas entre los cultivos transgénicos con respecto a los convencionales (HU et al., 2020; HAJIMOHAMMADI, et al., 2021; TYAGI et al., 2021; BAUTISTA et al., 2021; WAGABA et al., 2021). Otros estudios que evalúan la toxicidad de los alimentos transgénicos son llevados a cabo por científicos que trabajan en empresas que producen transgénicos, los cuales afirman su inocuidad (MCCLAIN et al., 2021; BRUNE et al., 2021). Sin embargo, otros estudios afirman que los alimentos transgénicos pueden ocasionar efectos adversos en la salud. Los estudios experimentales en animales han demostrado aumento de peso, cambios en el páncreas y riñones, efectos tóxicos para el sistema inmunológico, cambios en la bioquímica sanguínea, entre otros efectos (EL SHAMAI et al., 2012; EISSA et al., 2019;

Karalis et al.,2020). Aunado a esto, en una publicación reciente el investigador Seralini (Seralini, 2020) asegura que los alimentos y cultivos transgénicos tienen un principal rasgo fenotípico común para el que se ha modificado el 99% y es que están diseñados para ser cultivados con pesticidas, que pueden bioacumularse en las plantas y el consumidor, y expresar insecticidas en sus células.

Por otra parte, existe una preocupación de muchas entidades no gubernamentales en cuanto a si puede haber o no contaminación de cultivos transgénicos a los tradicionales. Al respecto, la OMS reconoce que se han dado casos de contaminación en los que se detectaron cultivos modificados genéticamente aprobados para alimentación animal o uso industrial en los productos destinados al consumo humano, sin embargo, la OMS asegura que varios países han adoptado estrategias para reducir la mezcla (World Health Organization, 2016).

A la fecha no existe en la actualidad evidencia científica contundente que respalde la teoría de que, asociado al consumo de alimentos modificados genéticamente en humanos se haya desarrollado alguna enfermedad a corto plazo sin embargo, tampoco hay evidencia que desvincule a los OGM de ocasionar daños en el organismo a largo plazo. Al respecto diversos autores (Tsatakis et al.,2017; Gomez, 2020; Karalis et al.,2020) concluyen que existe la necesidad de realizar mayor número de investigaciones que evalúen los riesgos y daños en la salud a largo plazo y que además es necesario exigir reglas y etiquetado de los productos alimenticios genéticamente modificados.

CAPÍTULO 3. MARCO DE ASPECTOS METODOLÓGICOS

3.1-Tipo de Investigación

3.1.1-Definición: El diseño de la investigación fue no experimental, y su alcance fue longitudinal y de enfoque mixto.

La metodología empleada en la investigación, se puede representar a través del siguiente esquema:

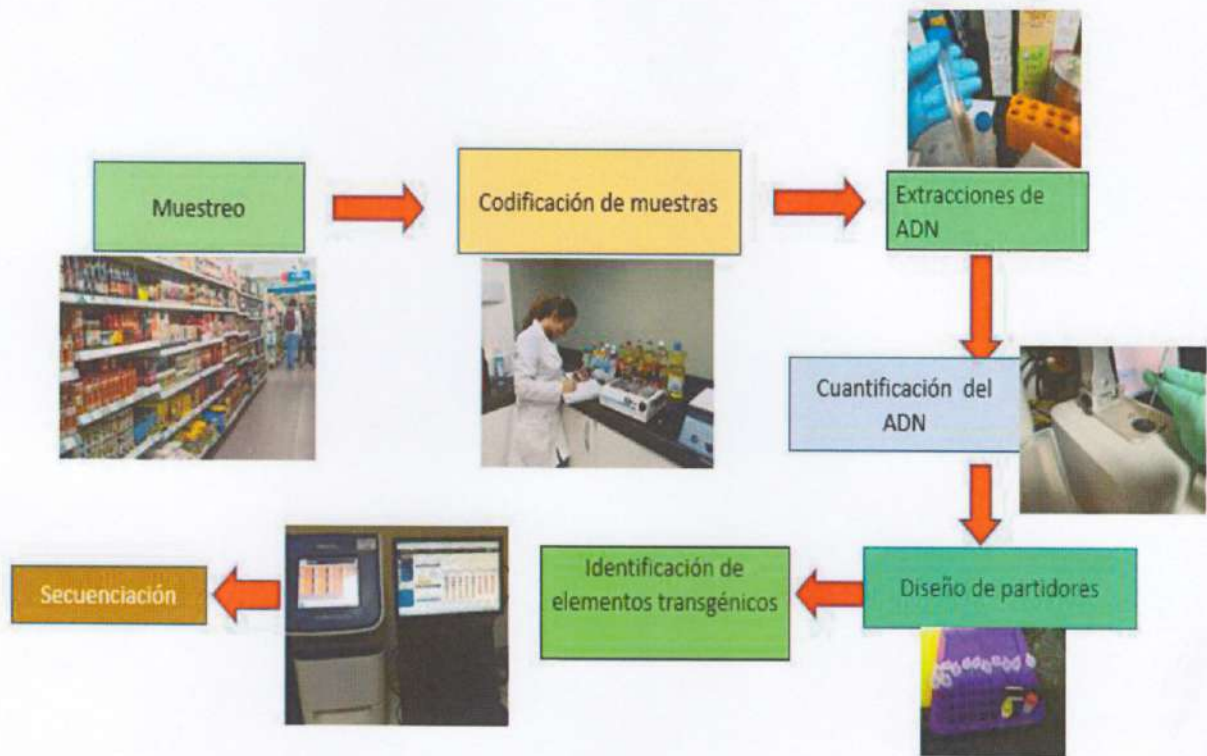


Figura 9. Metodología empleada en el estudio.

3.1.2-Justificación

Los organismos modificados genéticamente han generado gran debate social a nivel mundial sobre la conveniencia o no de su uso. Es por esto que algunos países han tomado medidas informativas tales como el etiquetado con respecto a los productos derivados de los OMGs para consumo tanto animal como humano. Mientras que países como China o Kazajistán están adheridos a la lista de los 64 países que exigen que todos los productos transgénicos sean debidamente etiquetados, en Panamá el etiquetado no está especificado por ley. De esta forma, el consumidor panameño no tiene posibilidad de elegir si llevar o no transgénicos a su mesa. Estados Unidos, Brasil y Argentina encabezan el ranking de productores de transgénicos o alimentos genéticamente modificados y actualmente en Panamá se importan muchos productos de esos países y a los mismos no se les realiza un análisis para detectar si son transgénicos o no, por lo tanto, no se le puede brindar al consumidor una información completa del alimento que va a comprar.

Por otra parte, son muy pocos los estudios relacionados con la detección de transgénicos realizados en Panamá. Por ello esta investigación aporta información científica relevante porque es la primera vez que se realiza en Panamá un estudio utilizando la técnica QRT PCR validada y recomendada por la Joint Research Centre (Centro Común de Investigación) de la Unión Europea, para detectar material transgénico en productos alimenticios procesados, la cual servirá como punto de referencia para que se desarrollen otras investigaciones en esta línea. Además, esta investigación es útil para lograr una toma de conciencia por parte de las autoridades en cuanto a la necesidad de la implementación de metodologías para hacer análisis de rutina y determinar elementos transgénicos en alimentos importados y de esta forma contribuir en la seguridad alimentaria del país.

3.2 Sujetos o fuentes de información.

3.2.1 Fuentes

Insumos alimenticios a base de soya, maíz, trigo, avena, arroz.

3.2.2 Equipo y material de laboratorio

SYBR GREEN PCR master mix de la marca invitrogen de Thermofischer, 2 unidades, DNTPs set 4x250 μ L, Taq DNA polimerasa recombinante, micro amp fast optical 48 platos, microtubos de 1,5 mL, tubos de PCR, gradillas, puntas amarillas y blancas, micropipetas, termociclador Thermofisher, sistema para electroforesis, agarosa, matraz Erlenmeyer, balanzas analíticas, termociclado Step One de Applied Biosystems, agitadores, hornos, agitadores, agua ultra pura libre de nucleasas, microtubos libre de nucleasas, autoclave, agitadores de bandeja, planchas de calentamiento para microtubo, kit de extracción de ADN de Thermofisher, morteros y pistilos.

3.3 Muestra

La muestra de trabajo estuvo constituida por: aceites, leches y bebidas a bases de soya, cereales y galletas, maíz en tortilla y harina de maíz, productos texturizados a base de soya, salsas de soya, fórmulas infantiles barras de cereales y snacks. En total se obtuvieron alrededor de 53 muestras. Luego se procedió a codificarlas según el país de origen y los ingredientes que contenían. En la **Tabla 5** se pueden observar los alimentos que fueron muestreados, clasificados según el tipo de alimento y país de procedencia. En total se muestrearon 10 aceites, 6 leches, 6 bebidas a base de soya, 6 salsas a base de soya, 7 cereales de maíz, 6 barras de cereal, 3 galletas que contienen lecitina de soya, 3 snack de maíz con lecitina de soya, 3 proteínas de soya, 2 tortillas de maíz, 3 fórmulas infantiles, 3 harinas de maíz y una salchicha de soya.

Tabla 5. Alimentos muestreados en los supermercados de la ciudad de David.

Código	Descripción	País de Origen	Total
001-010	Aceite de soya	Argentina, USA, Panamá- Boston, Brasil	10
011-016	Bebidas a base de soya	USA, Costa Rica y Panamá	6
017-022	Salsas a base de soya	USA, Panamá, El Salvador	6
023-029	Cereal de maíz	México, USA, Guatemala, Perú	7
030-035	Barras de cereal	USA, México, Colombia, Guatemala	6
036-038	Galletas	España, USA, Brasil	3
039-041	Snack de maíz y arroz	España, USA	3
042-044	Proteína de soya texturizada	Panamá	3
045-046	Tortillas de maíz	USA, Panamá	3
047-049	Fórmula infantil	USA, España, México	3
050-052	Harina de maíz	Colombia, Guatemala	3
053	Salchichas de soya	Costa Rica	1

3.3.1 Tipo de muestreo

3.3.1.1 Selección de los elementos muestrales

Las muestras fueron seleccionadas utilizando un muestreo por criterio y aleatorio en los diversos supermercados de la ciudad de David, para su selección se tomaron en cuenta los siguientes criterios: el país de origen (preferiblemente de países que importan transgénicos), además se seleccionaron muestras por tipo de producto que tuvieran maíz, soya y trigo.

Aunque no formara parte de los objetivos de la investigación, se decidió realizar un pequeño muestreo de los cultivos regionales para conocer si se están empleando semillas transgénicas. De esta forma, se logró muestrear hojas de maíz y arroz en distintos puntos de la provincia de Chiriquí (Bongo, San Lorenzo, San Juan, Alanje) donde se producen estos cultivos. En la **Tabla 6** se describe el tipo de cultivo y los sitios de muestreo empleados.

Tabla 6. Hojas muestreadas

Código	Variedad de hoja	Sitio de muestreo
H1	Hoja de maíz	Bongo
H2	Hoja de maíz	San Lorenzo
H3	Hoja de maíz	San Juan
H4	Hoja de arroz	Alanje
H5	Hoja de arroz	San Lorenzo

3.4 Métodos e instrumentos de investigación

3.4.1 Procedimiento experimental

3.4.1.1 Extracción y purificación del ADN

La primera etapa para la aplicación de técnicas moleculares para la detección de OMG en alimentos es el proceso de extracción de ADN. Dicho proceso de

extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN, y se basan en las características fisicoquímicas que exhibe la molécula (Grysson, 2010). Las extracciones de ADN se realizaron en el laboratorio de Bioquímica y Química Aplicada (CIBQUIA), ubicado en la UNACHI. Se seleccionó el método del Kit OGM de Thermofisher-IMEGEN para alimentos procesados, el cual es un método diseñado para la extracción de ADN de muestras de alimentos para análisis de material transgénico de una amplia gama de matrices, incluidas materias primas, alimentos procesados, piensos, bebidas, aceites, etc, eliminando eficazmente los inhibidores. Este método emplea la purificación de ADN a base de sílice, utilizando la tecnología de columna rotatoria. Cabe destacar que durante la investigación también se logró extraer ADN de hojas de maíz y arroz provenientes de distintos puntos de la provincia de Chiriquí.

Para la extracción de las hojas se empleó el método del Kit de Invitrogen PureLink Plant específicamente diseñado para extraer ADN de hojas y semillas.

3.4.1.1.1 Lisis

Para los alimentos procesados en estado sólido, el procedimiento inicia con la trituración pesando la cantidad establecida por el kit según el tipo de producto. Luego se le agregó cierta cantidad de buffer de lisis 1, dependiendo del tipo de producto y se le añadieron 20 μL de RNAasa. Luego se incubaron por media hora a 65 °C en un horno con agitación constante. Se centrifugaron por 10 minutos a 3800 rpm, se tomaron 385 μL del sobrenadante de cada muestra y se transfirieron a un microtubo de 1,5 mL, en el caso de que se observará algún precipitado se volvía a centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos. Terminado este proceso se le adicionaron 25 μL de proteinasa K, se mezclaron y se incubaron 56 °C por 1 hora. Luego se adicionaron 400 μL de buffer lisis 2, y se incubaron a 70 °C por 10 minutos. Después se le añadieron 420 μL de etanol absoluto.

En el caso de las hojas que fueron muestreadas se cortaron en pedazos pequeños luego se agregó 250 μL de tampón de resuspensión suministrado en el kit. Fue

necesario homogenizar el tejido de la muestra hasta que la muestra estuvo resuspendida. Luego se agregaron 15 μL de SDS al 20% y 15 μL de RNasa A (20 mg / mL). Se procedió a incubar el lisado a 55°C durante 15 minutos para completar la lisis. Luego se centrifugó el lisado a alta velocidad durante 5 minutos para eliminar los materiales insolubles y se transfirió el sobrenadante transparente a un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL sin alterar el sedimento. Luego se añadieron 100 μL de tampón de precipitación. Se procedió entonces a mezclar con vórtex e incubar en hielo durante 5 minutos. Luego se procedió a centrifugar a máxima velocidad en una microcentrifuga para 5 minutos a temperatura ambiente para producir un lisado. Finalmente se transfirieron 250 μL de lisado transparente a un tubo de microcentrifuga estéril y se agregaron 375 μL de tampón de unión con etanol al lisado y se mezcló bien.

3.4.1.1.2 Captación de ADN y lavados

En el caso de los alimentos procesados, para la parte de purificación de ADN se emplearon columnas que se acoplan a tubos colectores. Luego 600 μL de la muestra se hacen pasar a través de las columnas por centrifugación a 11000 x g por 1 minuto. En esta sección del proceso el ADN es retenido en la columna y el sobrenadante se descarta para repetir el procedimiento con los 600 μL restantes de la muestra, entonces se centrifugaron a 11000 x g por un minuto.

Para el lavado se utilizaron dos soluciones de lavado, denominadas “tampón 1” y “tampón 2”, las cuales son amortiguadores de pH que permiten limpiar el ADN que se encuentra unido a las columnas. Se agregaron 500 μL de la solución de lavado tampón 1 y se centrifugó a 11000 x g por un minuto. Se descartó el líquido del tubo colector y se adicionaron 600 μL de la solución de lavado tampón 2, se centrifugó a 11000 x g por 1 minuto. Se descartó el líquido en el tubo colector y se centrifugó nuevamente a 11 000 x g por un minuto.

Para las hojas se utilizaron columnas de centrifugado PureLink® en un tubo de recolección. Luego se agregó la muestra con Buffer de enlace. Se procedió a

centrifugar el tubo colector a $10.000 \times g$ durante 30 segundos a temperatura ambiente. Luego se desechó el flujo y se colocó las columnas de centrifugado en el tubo de lavado suministrado con el kit.

3.4.1.1.3 Recuperación del ADN de las columnas

Para los alimentos procesados el procedimiento fue el siguiente: inmediatamente después de realizado los lavados se procedió a eluir el ADN, para lo cual, se colocó la columna dentro de un microtubo nuevo, libre de nucleasas de 1,5 mL y se le añadió agua ultra pura libre de nucleasa, previamente calentada a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos. Luego se centrifugó a $11\ 000 \times g$ por 1 minuto para eluir el ADN. Finalmente, el ADN purificado se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores análisis. En el caso de las hojas, se colocó el tubo de centrifugado en un tubo estéril de 1,5 mL sin DNasa. Luego, se añadió 100 μL de tampón de elución o agua destilada ($\text{pH} > 7,0$). Luego se Incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó el tubo a la velocidad máxima durante 1 minuto. La elución en el tubo contenía el ADN purificado.

Para las muestras no procesadas se utilizó un procedimiento similar, se añadió 100 μL de tampón de elución (E1) agua destilada ($\text{pH} > 7,0$). Luego se procedió a incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó el cartucho a la velocidad máxima durante 1 minuto. La elución del tubo contiene el ADN purificado. Luego para recuperar más ADN, se realizó un segundo paso de elución utilizando 100 μL de tampón de elución (E1) o agua esterilizada. Al final se centrifugó la columna a temperatura ambiente a la velocidad máxima durante 1 minuto. El tubo de elución contiene el ADN purificado.

3.4.1.2 Diseño de partidores

En la **Tabla 7** se presentan las secuencias de los partidores empleados. Los partidores se diseñaron específicamente para ser usados en la técnica de QRT-PCR y la amplificación específica de fragmentos de genes pat, bar y cry, así como

elementos transgénicos no codificantes promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y terminador Nos (t-NOS), para los cuales, se cumplió con requisitos, tales como el tamaño de los amplicones obtenidos, el cual, para la técnica utilizada estaba entre 75 a 100 pb. Entre otras características que se consideraron para seleccionar los partidores a sintetizar, están el contenido de G/C, la especificidad longitud de los partidores, las temperaturas de fusión (T_m), capacidad para formar estructuras secundarias dímeros u horquillas (harpin).

Para diseñar los partidores se utilizaron los recursos del programa Primer Express y herramientas disponibles por vía web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y Gene Bank (Centro Nacional de información Biotecnológica, 2018). Posteriormente al diseño, se seleccionaron 20 partidores para sintetizar. Para la síntesis se utilizaron los servicios de la empresa Macrogen. Una vez sintetizados los partidores, se diluyeron con agua ultrapura libre de nucleasas y se prepararon los alícuotas de trabajo a una concentración de 10 μ M. Cabe destacar que se utilizaron los mismos partidores para determinar elementos transgénicos en alimentos procesados y en hojas.

Tabla 7. Partidores empleados

Código del Partidor en el laboratorio	Secuencias
Fbar 12	GAGTCGACCGTGTACGTCTC
Rbar12	CTTGAAGCCCTGTGCCTCC
Fbar08	CTTCAAGCACGGGAACTGGC
Rbar08	ATCAGATCTCGGTGACGGGC
Fpat 8	GTGTGGTCTTCCTTCGGTGT
Rpat8	GTGGCCGAATCCGTACTION
Fcry14	TGGCTTATCCTGCTGGAACG
Rcry14	ACTTCTGCTTCCCATTCCGG
FCAM 16	GACGTAAGGGATGACGCACA
RCAM16	TTCAGCGTGTCTCTCCAAA
FNOS18	GGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGC
RNOS18	CCCATCTCATAAATAACGTCATGCA
FNOS19	TGAATCCTGTTGCCGGTCTT
RNOS19	CCCATCTCATAAATAACGTCATGCA

3.4.1.3 Método para la detección de elementos transgénicos

El método empleado para la detección de elementos transgénicos fue PCR en tiempo real y una de sus variantes denominada análisis de fusión de alta resolución (con sus siglas en inglés HRM, High Resolution Melting), el cual, es un método de análisis posterior a la PCR basado en la detección de pequeñas diferencias en las

curvas de fusión (disociación) obtenida al aplicar un aumento progresivo de temperatura a las muestra obtenidas por PCR, hasta la fusión, al tiempo que se registra la pérdida de fluorescencia cada 0.3 °C en este caso. Se considera una muestra positiva para un elemento específico transgénico una vez que esta muestra amplificación para el par de partidores correspondiente.

3.4.1.3.1 PCR en tiempo real

Se aplicó la PCR en tiempo real mediante el uso de SYBR GREEN como agente intercalante y su señal de fluorescencia para determinar las amplificaciones en tiempo real de los genes cry, pat, bar, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador t-NOS, con sus respectivos partidores específicos para todas las muestras de ADN. Es importante resaltar que se usaron las mismas condiciones para el análisis de QRT-PCR para determinar elementos transgénicos en alimentos y en las hojas.

3.4.1.3.1.1 Preparación de la mezcla de reacción

La mezcla de las reacciones de amplificación fue preparada en un volumen final de 20 µL con 10 µL de del Marter Mix 10X el cual, contiene el SYBR Green, MgCl₂, dNTPs y la polimerasa (Applied Biosystems de USA). De cada una de las muestras se agregaron 8 µL y 1 µL de los respectivos partidores sentido y antisentido.

3.4.1.3.1.2 Condiciones de temperatura de la PCR

Inicialmente se corrió un programa de qRT-PCR utilizando las siguientes condiciones: 95 °C por 10 minutos, luego 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, y 60 °C por 1 minuto.

3.4.1.3.1.3 Condiciones para la captación de la fluorescencia

La detección y registro en tiempo real de la fluorescencia se realizó por cada reacción (en cada pozo) continuamente durante el proceso, en las etapas de polimerización y los datos recolectados se codificaron tomando en consideración la fecha de la corrida, las muestras, el par de partidores usado, el elemento transgénico objeto de la identificación y se guardaron en el equipo como experimentos independientes en la carpeta asignada para esta investigación.

3.4.1.3.1.4 Equipo y placas de reacción

Se utilizó el termociclador StepOne real time PCR system de Applied Biosystems. Las reacciones prepararon en placas ópticas de 48 pozos (micro amp fast optical, Applied Biosystems).

3.4.1.3.1.5 Obtención de las curvas de fusión para el análisis de HRM.

Una vez realizada la PCR, se procedió con fusión de los productos de amplificados, procedimiento que consiste en elevar gradualmente la temperatura desde 65 °C a 95°C, registrando la pérdida de fluorescencia del fluoróforo que en este caso se trató de SYBR GREEN. En esta etapa se obtiene información por cada pozo, a intervalos de 0.3 °C con lo cual, se genera una gráfica de decaimiento de fluorescencia con respecto a la temperatura, si se ha dado la amplificación de algún elemento. A estos resultados de la fusión de los productos de PCR, se les aplica una derivada lo que convierte el punto de inflexión típico de estas gráficas en un pico, el cual, está asociado a una temperatura de fusión que corresponde al amplicón obtenido. Cada pico corresponde a un resultado positivo para el elemento transgénico que se esté amplificando.

3.4.1.3.2 PCR convencional o de punto final

Este tipo de PCR se utilizó para amplificar muestras que dieron positivo en RT-PCR, tanto en alimentos procesados como en las hojas analizadas, con la finalidad de secuenciar dichos amplicones. Se utilizó un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), con capacidad para 96 microtubos.

3.4.1.3.2.1 Condiciones para las reacciones y temperaturas de la PCR

Las reacciones se prepararon en un volumen final de 25 µL, conteniendo los siguientes componentes: 1 µL de ADN (muestras positivas en RT-PCR), amortiguador de pH con Mg²⁺ 10X, 20 mM de cada dNTP, 1 µL de cada partidor, 1 U de DNA *Taq* polimerasa. Las temperaturas en el programa de la PCR fueron: un ciclo a 94 °C por 5 min, 40 ciclos con: 94 °C / 30 segundos, 53 °C / 30 segundos (alineamiento), 72 °C / 45 segundos (polimerización) y una última etapa de extensión a 72 °C durante 7min.

3.4.1.3.2.2 Visualización de los productos de PCR obtenidos en geles de agarosa

Para la visualización de los productos de PCR obtenidos se realizaron electroforesis geles de agarosa al 1.5% con buffer TBE (Tris-borato 0.045 M, EDTA 0.001 M) 50X y se utilizaron 8 µL de bromuro de etidio como agente intercalante para la visualización del ADN. En cada pocillo del gel, se cargaron 10 µL de la muestra la muestra con 2 µL de buffer de carga 6X y como marcador, PCR 100 pb Low Ladder. La electroforesis se realizó a 80 V durante 2 a 4 horas. La visualización se realizó bajo luz UV (302 nm) y los resultados se registraron fotográficamente. Luego las muestras seleccionadas fueron enviadas a secuenciar.

3.4.1.3.3 Secuenciación

Los productos seleccionados fueron enviados a secuenciar a la empresa Macrogen, una empresa coreana con amplia experiencia en la síntesis de plásmidos y análisis molecular, con sus respectivos plásmidos sentido o antisentido.

3.4.1.3.3.1 Tratamiento de la información Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Geneious X y contra las bases de datos de Gen Bank para establecer su identidad.

CAPÍTULO 4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 Muestras seleccionadas

Al realizar el muestreo, se encontraron en los supermercados una gran variedad de productos procesados importados que provenían de países que son los principales productores de transgénico en el mundo. De hecho, el 30,2% de los productos muestreados provenían de Estados Unidos de América, que es el productor número uno de transgénicos en el mundo (ISAAA, 2019). Otros productos muestreados provenían de países como Argentina, México, Colombia, Brasil, Costa Rica, Perú, Guatemala y El Salvador. La mayoría de estos países son productores de transgénicos o no tienen leyes de etiquetado estrictas. Cabe destacar que también se muestrearon productos nacionales y ninguno de estos productos tenían en su etiqueta algún llamado de atención referente a si contenía OGM o era libre de transgénicos. De hecho, del total de las 53 muestras solo 4 productos tenían algún llamado de atención referente a si contenían o no transgénicos. Otro criterio utilizado para la selección de las muestras fue que estas fueran o estuvieran preparadas a base de soya o maíz.

A pesar de no estar descrito como objetivo en nuestra investigación, se decidió hacer un muestreo de los cultivos de maíz y arroz debido a que estos cultivos son básicos en la alimentación del panameño. Para ello se tomaron muestras de hojas de arroz y maíz de distintos puntos de la provincia (Bongo, San Lorenzo, San Juan, Alanje), zonas productoras de estos cultivos. Aunque en Panamá aún no existe permiso de las autoridades para sembrar semillas transgénicas, se esperaba que estos cultivos dieran resultados negativos para los elementos transgénicos analizados.

4.2 Extracciones de ADN

Extraer ADN en una cantidad y calidad adecuada es el primero y más importante paso para lograr una detección confiable de OGM en alimentos (Ahmed, 2002; y Teng, et al., 2001). En este sentido, la calidad del ADN estará determinada

entonces por la longitud del fragmento y su grado de daño (por ejemplo, la depurinación), por lo tanto, varía según el método de extracción de ADN, el tipo de muestra, y el grado de procesamiento de la misma (Gryson,2010; Radaman et al.,2016). Estos factores al parecer dependen de la propia muestra, los procesos llevados a cabo durante la producción de los alimentos y los parámetros fisicoquímicos del método de extracción, siendo los kits los métodos más recomendados para realizar esta operación de extracción de ADN, ya que presentan ciertas ventajas sobre los métodos convencionales (Aguilera et al.,2014). Los kits empleados durante la investigación, el kit de extracción de OGM de Thermofisher para alimentos procesados y el kit Invitrogen PureLink Plant para extraer ADN de las muestras de hojas, permitieron una purificación rápida y sencilla del ADN para Se logro aislar ADN altamente purificado de una amplia variedad de diferentes tipos de muestras sin el uso de reactivos tóxicos.

El kit de extracción de OGM presenta grandes beneficios en comparación con otros productos disponibles comercialmente, entre los que se puede destacar:

- Alto rendimiento: aislamiento de ADN extremadamente puro ($A_{260} / A_{280} > 1.8$)
- Alta especificidad: adaptado a muestras de alimentos para análisis de material transgénico
- Alta eficiencia: el tiempo total del ensayo es menor que 2 horas, requiriendo pasos mínimos de manipulación.

El kit de extracción de OGM emplea la purificación de ADN a base de sílice utilizando tecnología de columna giratoria para proporcionar muestras para las pruebas de OGM. El kit se ha adaptado específicamente para el análisis de material transgénico de una amplia gama de matrices de muestra, incluidas materias primas, alimentos procesados y piensos. Eliminando eficazmente los inhibidores, el kit de extracción de OGM proporciona ADN aislado, altamente purificado, de manera rápida, confiable y segura (Thermofisher, 2020). La concentración y calidad del ADN obtenida con el kit de extracción varió de acuerdo al tipo de muestra. La concentración del ADN genómico total obtenido de las muestras de alimentos procesados, derivado del análisis espectrofotométrico, se situó entre los 1,1 ng.µL-

1 y 92,5 ng.µL⁻¹, como se observa en la **Tabla 8**. Siendo, las muestras de aceites, salsas de soya y algunas barras que contenían mermelada, las que presentaron los más bajos valores de concentración. Esto puede deberse a que son productos que han sido altamente procesados, y la calidad y cantidad se pierde durante ese proceso debido a que han estado sometidas a altas temperaturas (Coello et al.,2017) ya que el nivel de procesado de los productos muestreados influye en forma notable en cuanto a la integridad y calidad de ADN extraído.

En este sentido, se ha evidenciado que durante el proceso de refinado de aceites, la temperatura, el pH ácido y la adsorción por arcilla pueden reducir el contenido de ADN en aceite. Además, se ha demostrado, que en la etapa de desgomado durante la refinación del aceite, se elimina gran parte del ADN de la fase oleosa, siendo difícil la extracción del ADN en aceites (Gryson et al.,2004). Esto podría explicar el bajo contenido de ADN encontrado durante la extracción. Sin embargo la concentración obtenida para aceites (2,8-6,9 ng/uL) está dentro del rango esperado por el kit de extracción de Thermofisher (0-10 ng/uL).

De manera similar, la baja concentración de ADN obtenida a partir de salsas de soya podría explicarse en base al alto grado de procesamiento industrial a los que están sometidos estos productos. El proceso de producción de las salsas de soya consta de tres etapas básicas: en la primera las semillas de soya son hervidas y mezcladas con trigo tostado, luego se le adicionan dos tipos de bacterias el *Aspergellius oryzae* y *Aspergellius sojae* y se dejan reposar por 4 días, período de tiempo durante el que los hongos *A. oryzae* y *A. sojae*, producen la fermentación del trigo para generar azúcares sencillos como la glucosa, además de degradar las proteínas de la soya. En esta etapa de fermentación el ADN genómico se degrada, lo que podría explicarse por la digestión del ADN a través de ADNasas derivadas de las bacterias añadidas. Estudios también muestran que las etapas de molienda, mezcla y el paso mecánico de rectificado de la soya remojada es un paso crucial para la degradación del ADN (Coronado y Cárdenas,2020).

A pesar de la degradación que sufre el ADN durante el proceso de fabricación de las salsas de soya, las concentraciones de ADN obtenidas durante la extracción se

encuentran dentro del rango esperado según el kit de extracción de Thermofisher. En resumen, las concentraciones de ADN de todas las muestras estuvieron dentro de los rangos esperados según el protocolo del kit OGM extraction de Thermofisher.

Tabla 8. Rango de concentraciones y valores de la relación de absorbancia medidos a 260 nm / 280 nm, obtenidos para las muestras de ADN extraídas.

Alimento (unidades)	Concentración (ng/ μ L)	260/280 nm
Aceites (10)	2,8-6,9	1,23-1,71
Leches y bebidas de soya (6)	2,8-22,6	1,45-1,79
Salsa de soya (6)	1,1-50	1,53-1,98
Hojuelas de maíz (7)	12,8-69,2	1,44-1,74
Barras de cereal(6)	5,2-75,6	1,38-1,76
Galletas (3)	14,7-92,5	1,64-1,85
Snacks (3)	11,6-48,7	1,60-1,89
Proteína de soya texturizada (2)	17,8-31,8	1,89-1,96
Fórmulas infantiles(3)	8,5-33,7	1,62-1,85
Tortillas de maíz (2)	43,2-50,2	1,50-1,90
Harina de maíz(3)	10,3-51,8	1,80-1,90
Salchicha de soya(1)	3,9	1,75

En cuanto a la calidad del ADN, se puede observar que depende mucho del tipo de alimento, ya que, en algunos casos, las muestras presentaron valores cercanos al óptimo de pureza con respecto a las proteínas (entre 1,6 y 2), sin embargo, en otros

se obtuvo para las muestras bajos valores de la relación Abs 260 nm / 280 nm (Figura 10).

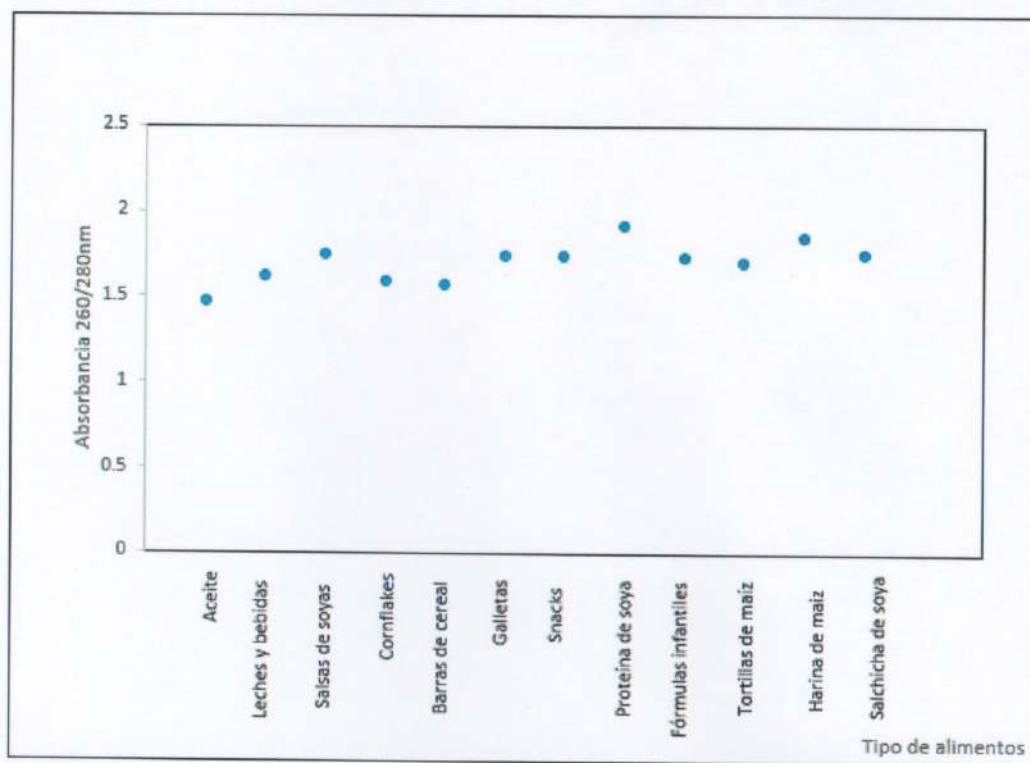


Figura 10. Relación de absorbancias versus el tipo de alimento

Estos resultados son los esperados, ya que muchas de las muestras provienen de matrices complejas derivadas de alimentos procesados. La obtención de bajos coeficientes 260/280 nm también han sido reportados en otros estudios que realizan extracciones de alimentos procesados, donde se han obtenido valores de 1,17; 0,99 y 1,33 para muestras como tofu, harina de soya y lecitina, respectivamente (Zimmermann et al. 1998) y de 0,96; 0,99; 0,95 y 0,98 para muestras de alimentos procesados de soya, maíz, papa y trigo, respectivamente (Pauli et al. 2000). De manera similar, en otros estudios ha sido imposible obtener ADN de buena calidad en alimentos como siropes, cereales, piensos, aceites y otras sustancias que se extraen conjuntamente con el ADN e inhiben la PCR (Margarit et al., 2006; Arun, Yilmaz y Muratoglu, 2013; Elsanhoty, Ramadan y Jany, 2011).

En la **Tabla 9** podemos observar las concentraciones obtenidas de la extracción de ADN de las hojas de maíz y arroz. Aunque las concentraciones obtenidas de las extracciones de las hojas no fueron muy altas, como se esperaban, ya que se extrajo ADN de material puro sin procesar. Según el protocolo del kit ,para obtener un alto rendimiento de ADN y minimizar la degradación, se debió utilizar muestras de plantas jóvenes y congelar las muestras en nitrógeno líquido inmediatamente después de su recolección. Este procedimiento no se realizó por lo que pudo haber afectado el resultado en cuanto a la concentración se refiere. Sin embargo, los valores de la relación 260/280 nm sí estuvieron dentro del rango óptimo esperado (Tabla 11), ya que la pureza del ADN extraído se puede evaluar mediante la medición de la absorción 260/280 nm la cual debe estar entre 1,5 y 2 para poder realizar una PCR posterior (Grysson, 2010).

Tabla 9. Concentración y valores de la relación de absorbancia medidos a 260/280 nm obtenidos para muestras de ADN de hojas.

Código de muestra	Concentración (ng/μL)	Relación 260/280 (nm)
H1	5,8	1,67
H2	4,9	2,00
H3	4,7	1,76
H4	1,4	2,00
H5	4,3	1,73

4.3 Los partidores para la identificación de elementos transgénicos mediante QRT-PCR

Los partidores son los componentes más críticos de cualquier ensayo de QRT-PCR puesto que la especificidad de la amplificación se consigue mediante un diseño adecuado de los mismos. Por lo general, se recomienda diseñar varios cebadores para cada ensayo (Bustin,2017). En la investigación, se utilizó el promotor de la subunidad 35S del virus mosaico de la coliflor y el t-NOS para realizar la fase de cribado, ya que estas secuencias están presentes en muchas de las plantas modificadas genéticamente (Odell et al.,1985; Barbau-Piednoir,2014).

Por otra parte, para realizar la fase de identificación se diseñaron partidores para los genes *bar*, el gen *pat*, y *cry*, ya que hay varios reportes del uso de éstos como marcadores de selección específicamente en plantas de soya (Zhang et al., 1999; Paz et al., 2004; Zeng et al., 2004). Los partidores diseñados fueron seleccionados, de tal forma que tuvieran las características deseadas para el análisis, ya que no solamente influye que tengan una secuencia capaz de hibridar específicamente con la secuencia de ADN a amplificar, evitando que lo haga en lugares inespecíficos, consigo mismo o con el otro primer, sino también el contenido en G+C del oligonucleótido, también es importante, puesto que no debe ser más del 55% de la secuencia, ya que estas uniones son fuertes y por ende es necesario aplicar mucha energía para romperlas evitando que se pueda adherir a la secuencia blanco (Tamay de Dios et al., 2013). De acuerdo a los datos mostrados en la **Tabla 10**, todos los partidores diseñados presentaron un %de G-C entre 46 a 63%, por lo que se encuentran en el rango adecuado para ser utilizados en el análisis de QRT-PCR.

Otra característica que se consideró en el diseño fue la longitud del partidador, ya que la especificidad de la amplificación depende de la longitud del mismo y se prefirieron aquellos cuya longitud fuera corta. Como podemos observar en la **Tabla 10** la mayoría de los partidores diseñados estuvieron en el orden de 20 pb. Por otra parte, la temperatura de fusión (T_m) también es un factor que se consideró durante el diseño de los partidores. Cabe destacar que las temperaturas de fusión dependen del contenido de C-G, de las condiciones de hibridación, la presencia de agentes desnaturizantes y la longitud del partidador. Para el análisis con PCR se prefieren temperaturas de fusión entre 55-65°C y es común utilizar temperaturas de anillamiento, 5 °C por debajo de la temperatura de fusión más baja del par de partidores utilizados (Innis y Gelfand, 1990). En la investigación se diseñaron partidores que tenían T_m entre 58°C y 63,5°C, estos valores están dentro del rango de la temperatura recomendada en la literatura.

En la **Tabla 10** se muestran cuáles son las características de los partidores que se diseñaron para detectar los elementos transgénicos en los alimentos. Se puede observar que los productos esperados son pequeños de alrededor 100 pb pues en

la mayoría de los estudios se recomienda usar partidores que amplifiquen fragmentos de menos de 100 pb ya que la temperatura de fusión aumenta con la longitud del partidor y temperaturas de fusión muy altas (por encima de 80°C) pueden causar problemas, porque la polimerasa es menos activa a esas temperaturas (Ogasawara et al.,2003;Bustin y Huggett 2017). La longitud de la secuencia es fundamental para la asociación y determina la especificidad de la reacción, un partidor debe ser lo suficientemente complejo de tal manera que la probabilidad de anillamiento con una secuencia diferente a la secuencia de interés, sea muy baja. (Bustin y Hugget, 2017). Por lo general si se seleccionan correctamente los partidores y se producen dímeros durante la amplificación, estos tendrán una temperatura de fusión más baja que la temperatura de fusión de los partidores seleccionados, y va a servir para discriminar cuál muestra da un resultado verdadero y cuál da dímeros de partidor en una gráfica HRM.

Se diseñaron 20 partidores en total, los que se muestran en la **Tabla 10**. Los partidores sintetizados fueron diluidos como se recomienda con agua ultra pura y se guardaron a -20°C para ser utilizados posteriormente.

Tabla 10. Características de los partidores empleados para detectar los elementos transgénicos en alimentos procesados y hojas.

Partidor	Longitud	%GC	Concentración nmol	Peso molecular	Tm °C	Productos esperados (pb)
Fbar 12	20	60	30	6104	62,5	99
Rbar12	19	63	32	5713	61,7	99
Fbar08	20	60	30	6128	62,5	98
Rbar08	20	60	30	6160	62,5	98
Fpat 8	20	55	30	6141	60,5	90
Rpat8	19	63	32	5765	61,7	90
Fcry14	20	55	30	6123	60,5	96
Rcry14	20	55	30	5992	60,5	96
FCAM 16	20	55	30	6197	60,5	91
RCAM16	20	50	30	6026	58,4	91
FNOS18	24	46	30	7387	63,5	108
RNOS18	21	52	30	6424	61,3	108
FNOS19	20	50	30	6092	58,4	105
RNOS19	20	50	30	6092	58,4	105

4.4 Detección de elementos transgénicos por qRT-PCR

El análisis de OGM en alimentos como vimos en el marco teórico, puede darse en varios niveles, dependiendo de los objetivos de la investigación. En ésta investigación, se realizó un cribado o screening (promotor 35S y t-NOS) y además se identificaron algunos elementos específicos del transgén (gen pat, gen bar, gen cry1Ab). El screening se realizó mediante la detección de las secuencias reguladoras usadas con mayor frecuencia en plantas modificadas genéticamente: el promotor 35S y el terminador t-NOS del gen de la Nopalina Sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*. Este método es considerado tanto por la Unión Europea y por las normas ISO 21569:2005 (Organización Mundial de la Salud, 2007) para el análisis cualitativo de OGM.

Por otra parte, en cuanto a la identificación de los elementos específicos, se logró la detección genes transgénicos como el gen bar, cry1ab y pat, genes muy comunes en la transformación de los alimentos y plantas (Van den Bulcke et al., 2010).

Cabe destacar que a nivel internacional, la técnica molecular validada por el Centro Común de Investigación Europea (JRC) para la detección cualitativa y cuantitativa de OGMs, es la PCR en tiempo real (QRT-PCR), la cual posee un grado de sensibilidad del 0,01% en la detección de secuencias derivadas de OGM. Además, con esta técnica se logra reducir los resultados falsos negativos que podría surgir en alimentos procesados que posean una baja proporción de material transgénico (Carvajal, 2017).

Aunado a esto, existen diversas investigaciones en las que se demuestran la confiabilidad del método QRT-PCR para detectar elementos transgénicos tanto en alimentos procesados como en plantas (Wu et al., 2010; Chaouachi et al., 2013; Gutiérrez et al., 2015; Hafsa et al., 2016; Yang et al., 2018).

En la **Tabla 11** se puede observar que el 50,9 % (27/53) de las muestras de alimentos procesados analizados contienen al menos una secuencia transgénica. De estas muestras el 9,4% de las muestras resultaron positivas un para el promotor CaMV35S (5/53). La mayor parte de las muestras positivas para dicho promotor

consistían en productos que contenían maíz como cornflakes, tortillas de maíz, y harina de maíz. De igual forma se observó que el 37,7% (20/53) de las muestras dieron positivas para el terminador t-NOS. Así mismo, se observa que las muestras que presentaron mayor coincidencia con el t-NOS correspondían a las muestras de aceite y cornflakes hechos a base de soya y maíz. Con relación a los demás genes transgénicos se detectaron en las siguientes proporciones en los alimentos: bar 39,6% (21/53), pat 3,8% (2/53), cry1Ab 1,9 % (1/53). Estos resultados concuerdan con la información brindada por ISAAA, quien en 2019 publicó que los cultivos que más se siembran a nivel mundial son aquellos que tienen incorporada la resistencia a un herbicida (gen pat o bar), que ocupan el 47% de la superficie cultivada, seguidos de las variedades con ambas características (42%) y de las variedades insecticidas Bt (genes crys) (12%).

Cabe destacar que 9/10, es decir, el (90 %) de los aceites procedentes de Estados Unidos, Brasil y Argentina dieron positivo para el gen bar, lo que nos indica que se utilizaron materias primas modificadas genéticamente para la elaboración de estos aceites. Estos resultados podrían señalar que en alguno de estos países todos sus aceites a base de soya contengan al menos un elemento transgénico, puesto que además que 9 muestras dieron positivas para el gen bar, 6 muestras de aceites también dieron positivas para el t-NOS y una muestra dio positiva para el gen pat. También recordemos que estos países son los principales productores de aceite de soya en el mundo y que además son los países de los que Panamá importa aceites en mayor cantidad (USDA/FAS, 2020b; Siagudo, 2019). En efecto, este resultado es el esperado, pues existe evidencia que dentro de los 5 países productores de transgénicos en el mundo se encuentran precisamente Estados Unidos, Brasil y Argentina (ISAAA,2019). De igual forma podemos observar que en el caso de las muestras de salsas de soya se obtuvo que 3/6, es decir el 50% de las muestras dieron positiva al gen bar mientras que 2/6, es decir el 33% dieron positivas al t-NOS. Lo que nos indica una alta incidencia de elementos transgénicos para las salsas de soya analizadas. Estos resultados son similares a un estudio en donde se analizaron salsas de soyas y también se encontró que a pesar que las muestras

dieron negativo para CAMV35S, se encontraron muestras positivas al t-NOS (Ahatović et al., 2018).

Cabe resaltar que actualmente la soja es el cultivo genéticamente modificado (GM) más cultivado y un ingrediente en muchos productos alimenticios en todo el mundo. De hecho los resultados obtenidos durante un estudio realizado en Uruguay, en donde se obtuvo el 95% de estos alimentos presentaba un contenido superior al umbral porcentual establecido para etiquetado de material GM, se observó que existe una mayor presencia de material GM en los productos que contienen soja en comparación con los que contienen maíz (Arleo et al.,2020).

Otro tipo de alimento que presentó una alta incidencia de elementos transgénicos detectados fueron los cereales de desayuno o cornflakes. Para estas muestras se observaron que 5/7 dieron positivas para el gen bar, lo que representa el 71% de los cereales muestreados. Además, también se encontró que 3/7 de las muestras dieron positivas al promotor CAMV35S, 1/7 dieron positivas al gen pat, y al gen cry1Ab y 6/7 dieron positivas al t-NOS. Se observó que las muestras de cornflakes fueron las que más elementos transgénicos presentaron y además representa uno de los productos que más importa Panamá (INEC,2017). Cabe resaltar que ninguno de los cornflakes analizados tenía en su etiqueta especificado que contenía transgénicos y por tanto se le está cohartando la posibilidad al consumidor de elegir.

Tabla 11. Detección de elementos transgénicos en alimentos

Tipo de muestra	Número de muestras	País de Origen	CAMV35S	bar	pat	cry1Ab	t-NOS
Aceites	10	Argentina, E.U.A, Brasil, Panamá-Boston	-----	9	1	-----	6
Leche de soya	6	E.U.A	-----	1	----	-----	1
Salsa de soya	6	EUA, Panamá, El Salvador	-----	3	----	----	2
Hojuelas de maíz	7	México, E.U.A, Perú, Guatemala	3	5	1	1	6
Barras de cereal	6	E.U.A, México, Colombia, Guatemala	-----	2	----	-----	1
galletas	3	E.U.A, Brasil,	-----	-----	----	-----	-----
snack	3	España, E.U.A	----	-----	----	-----	2
Proteína de soja texturizada	3	Panamá	-----	----	----	-----	-----
Salchicha de soya	1	Costa Rica	-----	-----	----	----	-----
Fórmulas infantiles	3	España, México, E.UA	-----	1	----	----	1
Tortillas de maíz	2	Panamá	1	----	----	-----	1
Harina de maíz	3	Colombia, Guatemala	1	----	----	-----	-----
Totales	53		5	21	2	1	20

Cabe destacar que algunas muestras presentaron resultados positivos para t-NOS, pero no para la región promotora CaMV35S o viceversa. Lo mismo se observó en otros genes transgénicos, los cuales aparecieron en algunas muestras, pero no en todas. Según Carvajal (2017), lo anterior puede deberse a que la muestra presenta eventos transgénicos que no poseen ciertos elementos transgénicos en su construcción, o a una dificultad en la detección de esta secuencia debido al alto grado de procesamiento de los alimentos que podría degradar el ADN y provocar que las trazas del transgén no estén intactas en los ácidos nucleicos totales. Investigaciones similares en otros países, han demostrado la presencia de elementos transgénicos en alimentos con niveles detectables. Por ejemplo, en Costa Rica, un estudio muestra que, de un total de 16 productos analizados, entre tortillas de maíz y harina de maíz, el 50% de estos resultaron fueron positivos para la región t-NOS, sin embargo, se presentaron problemas para amplificar la región CAMV35S (Jiménez, 2003). En una investigación más reciente efectuada también en Costa Rica se demostró que el análisis de transgénicos en piensos y alimentos, sin procesar y procesados, comercializados contenía de 86% para el promotor CAMV35S, 72 % para el terminador t-NOS y 40% para los eventos identificados. Los eventos más frecuentemente detectados en este estudio fueron MON810, NK603 y Bt11. Cabe destacar que en estos eventos encontrados el gen introducido para los eventos MON810 y NK603 fue el gen cp4 epsps que le confiere a la planta tolerancia al herbicida glifosato. Sin embargo, para el evento Bt11 los genes introducidos fueron el gen cry1 Ab que confiere resistencia a insectos y el gen pat que confiere resistencia a herbicidas (Carvajal, 2017). De manera similar, en Turquía se reportó que un 78 % de 19 alimentos para animales y más del 10% de 56 alimentos procesados analizados contenían soya transgénica, basándose en la detección del promotor CAMV35S y el terminador t-NOS (Turkec et al., 2015). Por otro lado, reportes en Portugal evidenciaron que se hallaron un 23% de ingredientes OGM en muestras de alimentos procesados (Grazina et al., 2017) y se halló un 30% de muestras positivas para el promotor CAMV35S y 10% para el t-NOS (Fernández et al., 2014), mientras que en Irán, el 20% de las 25 muestras, analizadas para el promotor CAMV35S, de alimentos procesados a base de maíz, fueron positivas

(Rabiei et al., 2013). En otro estudio realizado en Colombia, los resultados indican la presencia de las proteínas cry 34Ab1, y cry 3Bb1, como parte del maíz GM que podría haber sido usado para la elaboración de hojuelas de maíz (Castillo, 2017).

Estos resultados evidencian que cada día son más los países cuyos alimentos procesados contienen elementos transgénicos y que además los mismos están presentes en diversos tipos de alimentos. En la **Tabla 12** se puede observar que el país que presentó el mayor porcentaje de positividad de elementos transgénicos en alimentos fue Argentina, con un porcentaje del 50%, y además de las 5 muestras recolectadas de aceites de soya, las 5 dieron positivas para algún elemento transgénico. Este resultado es el esperado, ya que Argentina es el tercer productor de cultivos transgénicos en el mundo, además se sitúa como el cuarto país productor de aceite de soya en el mundo (ISAAA,2019; Siagudo, 2019).

Tabla 12. Porcentaje de positividad de elementos transgénico por tipo de producto asociado al país de origen.

Tipo de producto	País	Muestras positivas respecto al total de muestras (%)	Muestras positivas respecto a las muestras de ese país (%)
1-Aceite de soya	Argentina	50	100
2-Leche de soya	Estados Unidos	33	50
3-Salsas china	Estados Unidos	33	100
4-cornflakes	México	43	100
5-Barras de cereal	México	33	67
6-Galletas	España y Brasil	33	100
7-Snack	España y Estados Unidos	33	100
8-Proteína Texturizada de soya	Panamá	33	33
9-Tortillas de maíz	Panamá	50	50
10-Leche en polvo	España	33	100
11-Harina de maíz	Colombia	33	50
12-Salchichas de soya	Costa Rica	0	0

De igual forma se puede observar que los productos importados de Estados Unidos presentaron el mayor número de muestras positivas en diversos tipos de alimentos, ya que el 33% de las muestras dieron resultados positivos en leches de soya, salsas chinas y snack. Aunado a esto también se observa que es uno de los países que mayor porcentaje de muestras positivas obtuvo respecto a las muestras analizadas de ese país. Quiere decir que por ejemplo del total de muestras de leche de soya provenientes de Estados Unidos analizadas, la mitad dio positivo a algún elemento transgénico.

Estos resultados concuerdan con lo esperado, ya que como vimos anteriormente Estados Unidos es uno de los principales países importadores de alimentos en Panamá. Además de ser el productor número uno de cultivos transgénicos en el mundo (USDA/FAS, 2019; ISAAA,2019).

En cuanto al análisis de las muestras de hojas realizadas mediante la técnica de QRT-PCR, se puede observar que de las 5 muestras de hojas analizadas todas dieron positivas para algún elemento transgénico. Siendo los elementos transgénicos bar y t-NOS los únicos que dieron positivos en este caso. Esto no quiere decir que las muestras no contengan otro tipo de elemento transgénico, sino que de los que buscábamos sólo el bar y el t-NOS dieron positivos en el análisis realizado en esta investigación.

Tabla 13. Detección de elementos transgénicos en hojas de maíz y arroz

Código de muestra	Tipo de hoja	Sitio de muestreo	CAMV35S	bar	pat	cry1Ab	t-NOS
H1a	Maíz	Bongo	-----	+	-----	-----	+
H2	Maíz	San Lorenzo	-----	+	-----	-----	-----
H3	Maíz	San Lorenzo	-----	+	-----	-----	+
H4	Arroz	Alanje	-----	+	-----	-----	+
H5	Arroz	San Lorenzo	-----	+	-----	-----	+

Cabe destacar que estos resultados no son los esperados, pues la Comisión de Bioseguridad no ha otorgado actualmente permisos para comercializar semillas transgénicas de arroz o maíz en el país para cultivos (CIISB,2020).

La **Figura 11** nos muestra el gráfico obtenido con el método de QRT-PCR en donde se utilizó la técnica HMR (Hight Resolution Melt) y se puede observar que las muestras que dieron positivas tenían una temperatura de fusión (T_m) muy próximas entre sí aproximadamente a los $74,09^{\circ}\text{C}$ para el gen bar. La curva de disociación es la representación gráfica del proceso experimental de amplificación por PCR-tiempo real, es la etapa en la que se aumenta la temperatura del sistema de reacción para que todas las cadenas de ADN que se encuentren en doble cadena se disocien a cadenas simples. De esta forma las moléculas de SYBR Green que se encontraban unidas al ADN de doble cadena se liberan, lo que se observa como una disminución de la fluorescencia (Tamay et al., 2013).

En una curva de disociación como la de la **Figura 11**, se representa la intensidad de la fluorescencia frente a la temperatura y se traza la primera derivada negativa. En este tipo de curva la derivada representa un pico característico a cada

amplificación, conocido como temperatura de disociación (melting temperature o T_m). La T_m es la temperatura a la cual el 50% de los pares de bases de una doble cadena de ADN se separan. La misma va a depender del tamaño del ADN de doble cadena y de su composición en bases nitrogenadas. En este sentido, cuanto mayor sea el contenido de GC (guanina-citosina) y más grande sea el tamaño del amplicón, más alta será la temperatura de disociación (Flores et al., 2007; Vinueza, 2009). Para discriminar los productos específicos de la QRT-PCR es necesario saber que estos se disocian a una temperatura más alta que los dímeros de partidor (Vinueza, 2009). En la **Figura 11** se puede observar un solo pico definido con una T_m de 74,09°C (este pico correspondería a la T_m de los productos específicos). En este gráfico no se observó otra señal que indique que existen dímeros de partidor. Y si se hubiesen formado, se observarían aproximadamente a los 60° C (que fue la temperatura de fusión aproximada de los partidores diseñados), a una temperatura inferior a la señal de los productos específicos amplificados. Por tanto, esta técnica permite descartar los dímeros de partidores formados durante la reacción de amplificación, para los cuales se observan picos de fusión que presentan una intensidad de fluorescencia inferior al de las muestras.

En la **Figura 11** se observan que las curvas que corresponden a las muestras 1,18,27 y 37 dieron positivas para el gen bar sin embargo se observó la ausencia del gen bar en la muestra 38, al no mostrar un pico cercano a los 74 °C. Por otra parte, podemos observar también que la muestra 27 presentó un pico mayor, por lo que se espera que sea esta muestra la que contenga mayor contenido de GC ya que la temperatura de fusión depende en gran medida de este factor y del tamaño del amplicón (Vinueza , 2009; Debode, 2017).En la **Figura 11** se puede apreciar también un desplazamiento de la muestra 37, y es muy probable que un cambio en un puente de hidrógeno menos sea la causa de ese desplazamiento. Esto indica la gran sensibilidad que tiene el tinte SYBR Green para detectar OGM en alimentos. Pues recordemos que el SYBR Green se une al surco menor de la hebra de ADN. Existen múltiples estudios que evidencian la sensibilidad del SYBR Green al detectar objetivos transgénicos en alimentos permitiendo distinguir hasta pares de

bases (Barbau-Piednoir et al.,2012; Barbau-Piednoir et al., 2014; Oviedo et al., 2020).

Adicionalmente se ha observado que la cinética de las curvas de amplificación evoluciona en función de la longitud del amplicón, y los amplicones más pequeños producen un mayor nivel de fluorescencia para la fase de meseta (Debode et al.,2014) por lo cual hace que la técnica de QRT-PCR sea efectiva para detectar elementos transgénicos en alimentos procesados.

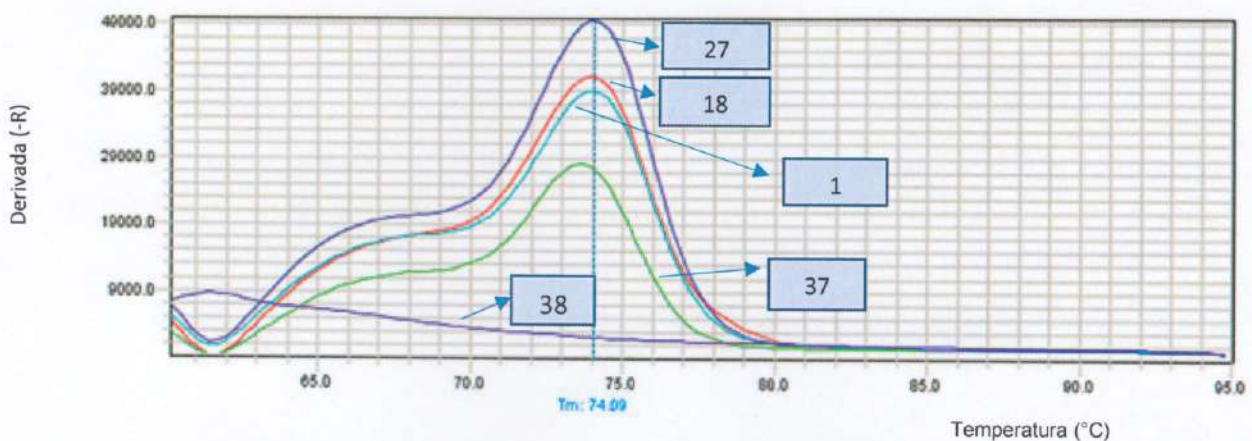


Figura 11. Curva de disociación o fusión (melt curve) para algunas muestras analizadas.

En el estudio realizado se utilizó el tinte SYBR Green debido a su simplicidad y capacidad de detectar concentraciones bajas de ADN de doble cadena, además de ser más económico que las sondas específicas. Sin embargo, aunque presenta algunas desventajas, como su falta de especificidad, esto se puede evitar implementando el análisis de la curva de disociación para verificar si se está amplificando la secuencia diana u otra secuencia no objetivo (Hernández et al., 2004; Gašparič, et al., 2010; Navarro et al., 2015).

También existen otros tintes de unión de ADN que han sido mejorados y son conocidos como los de tercera generación como SYTO9 y EVA Green, que ofrecen varias ventajas, como ser menos inhibidor de la PCR que el SYBR Green I, y se

pueden utilizar en condiciones de saturación hasta generar mayores señales fluorescentes (Gašparič, et al.,2010; Navarro et al.,2015). Sin embargo en diversos estudios en donde se compararon los reactivos químicos para detección de OGM (sondas TaqMan, MGB, MB, LNA CPT, Plexor ,LUX, AmpliFlour ,SYBR Green I) mediante la técnica de QRT-PCR, se determinó la eficiencia de cada una en la amplificación por PCR, los límites de detección y cuantificación, y se encontró que ninguna de las químicas empleadas era significativamente mejor que las otras. En estos estudios se concluyó que SYBR pueden funcionar igualmente bien, pero puede necesitar más optimización antes de su uso (Gašparič, et al., 2010; Bener et al., 2019).

4.5 Secuenciación

La secuenciación se utiliza como técnica de confirmación positiva en la presencia de una determinada secuencia de ADN, tras su detección por PCR en tiempo real. Generalmente se utiliza para la autenticación genética de alimentos (autenticación de especies o detección de componentes de origen animal o vegetal no deseados en el alimento). Muchos autores coinciden que la verificación de los productos de la PCR se puede realizar mediante secuenciación directa de los productos de la misma (Wolfram,1997;Ojeda, 2014; Kang,2019).

Con el fin de confirmar la identidad de las especies analizadas por PCR en tiempo real, se seleccionaron muestras para secuenciar. Sin embargo, al secuenciar productos de PCR, se requiere una cantidad de 20 ng por cada 100 pares de bases en longitud del fragmento, a una concentración mínima de 10 ng/uL, es por ello que para obtener fragmentos de pb más grandes se procedió a realizar la PCR convencional. Las muestras seleccionadas fueron las que en los ensayos por QRT-PCR dieron positivas, las cuales a continuación se presentan en la **Tabla 14**. En dicha tabla se puede observar las muestras amplificadas, los partidores empleados y el producto esperado en los geles. Los amplicones elegidos para secuenciar fueron aquellos que en la electroforesis presentaron los tamaños esperados.

En la **Tabla 14** también se observó que los resultados de amplificación por PCR en punto final coinciden en su mayoría con los que se obtuvo mediante el análisis de QRT-PCR. No obstante, debido a que el límite de detección de la técnica de PCR convencional (0,1% GM) es mayor que el definido para la técnica de PCR en tiempo real (0,01%GM), algunas muestras que resultaron positivas para la presencia de la secuencia blanco en la técnica QRT-PCR, no pudieron ser definidas mediante la visualización en geles de agarosa, como sucedió en las muestras 4 y 7 del t-NOS, y de las muestras H2 y H3 del del prom CAMV35S en el PCR convencional, pero sí se detectaron señales en el QRT-PCR. Estos resultados coinciden con los resultados de otro estudio en el cual buscaban secuencias transgénicas en alimentos procesados (Oviedo et al.,2020), en el cual algunas muestras positivas con la técnica PCR en tiempo real fueron negativas cuando se amplificaron con la técnica de PCR convencional.

Tabla 14. Regiones amplificadas por PCR convencional para la posterior secuenciación de las muestras.

Código de muestras	Elemento transgénico	Partidores	Producto (pb)	Resultado
25	Promotor CAMV35S	FCAM16/RCAM16	91	Fuerte
26	Promotor CAMV35S	FCAM16/RCAM16	92	Fuerte
27	Promotor CAMV35S	FCAM16/RCAM16	93	Fuerte
43	Promotor CAMV35S	FCAM16/RCAM16	94	Fuerte
50	Promotor CAMV35S	FCAM16/RCAM16	91	Negativo
H1	Promotor CAMV35S	FCAM16/RCAM16	95	Fuerte
H2	Promotor CAMV35S	FCAM16/RCAM16	95	Negativo
H3	Promotor CAMV35S	FCAM16/RCAM16	95	negativo
H4	Promotor CAMV35S	FCAM16/RCAM16	96	Negativo
H5	Promotor CAMV35S	FCAM16/RCAM16	96	Tenue

Código de muestras	Elemento transgénico	Partidores	Producto (pb)	Resultado
1	bar	FBAR08/RBAR08	98	Tenue
2	bar	FBAR08/RBAR08	98	Tenue
3	bar	FBAR08/RBAR08	98	Negativo
4	bar	FBAR08/RBAR08	98	Tenue
5	bar	FBAR08/RBAR08	98	Tenue
6	bar	FBAR08/RBAR08	98	Tenue
7	bar	FBAR08/RBAR08	98	Tenue
9	bar	FBAR08/RBAR08	98	Negativo
10	bar	FBAR08/RBAR08	98	Fuerte
12	bar	FBAR08/RBAR08	98	Tenue
15	bar	FBAR08/RBAR08	98	Negativo
18	bar	FBAR08/RBAR08	98	Fuerte
19	bar	FBAR08/RBAR08	98	Negativo
21	bar	FBAR08/RBAR08	98	Negativo
23	bar	FBAR08/RBAR08	98	Negativo
25	bar	FBAR08/RBAR08	98	Fuerte
26	bar	FBAR08/RBAR08	98	Fuerte
27	bar	FBAR08/RBAR08	98	Negativo
29	bar	FBAR08/RBAR08	98	Negativo
32	bar	FBAR08/RBAR08	98	Negativo
45	bar	FBAR08/RBAR08	98	Fuerte
H1	bar	FBAR08/RBAR08	98	Tenue
H2	bar	FBAR08/RBAR08	98	Negativo
H3	bar	FBAR08/RBAR08	98	negativo

Código de muestras	Elemento transgénico	Partidores	Producto (pb)	Resultado
H4	bar	FBAR08/RBAR08	98	Negativo
H5	bar	FBAR08/RBAR08	98	Tenue
4	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Negativo
5	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Fuerte
6	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Fuerte
7	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Tenue
9	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Negativo
10	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Tenue
12	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Fuerte
15	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Fuerte
18	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Tenue
21	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Tenue
22	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Tenue
23	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Tenue
25	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Fuerte
26	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Fuerte
27	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Fuerte
29	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Negativo
37	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Tenue
38	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Tenue
43	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Fuerte
45	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Tenue
H1	t-NOS	FNOS18/RNOS18	108	Fuerte

Código de muestras	Elemento transgénico	Partidores	Producto (pb)	Resultado
4	t-NOS	FNOS19/RNOS18	210	Tenue
12	t-NOS	FNOS19/RNOS18	210	Tenue
23	t-NOS	FNOS19/RNOS18	210	Tenue
26	t-NOS	FNOS19/RNOS18	210	Tenue
27	t-NOS	FNOS19/RNOS18	210	Tenue
2	pat	FPAT08/RPAT08	90	Fuerte
23	pat	FPAT08/RPAT08	90	Fuerte

En la **Figura 12** se pueden apreciar los productos de amplificación de las muestras 25, 26, 27, 43 y H1 para el promotor CAMV35S y en menor intensidad H5, 1, 2, 4, 5, 6, 7 para el gen bar. Sin embargo, no se observa amplificación para las muestras 50, H2, H3, H4. Todas las muestras que fueron amplificadas utilizando la técnica de PCR en punto final tenían amplicones cortos de aproximadamente entre 90 a 210pb.

Por otra parte, es importante mencionar que no fue posible amplificar fragmentos de tamaños mayores, lo cual es una evidencia del nivel de fragmentación del ADN analizado, debido a los intensos procesos (alta temperatura, tratamiento mecánico, etc) que han sufrido los alimentos durante el proceso de manufactura. Aunque la detección de elementos transgénicos en alimentos procesados se hace más difícil que en plantas debido al manejo térmico y mecánico de la muestra. Existe evidencia que la técnica de QRT-PCR es útil en estos casos. Un ejemplo es la investigación realizada por Ogasawara y otros en el 2003, quien estudió la fragmentación del ADN en alimentos procesados elaborados a partir de soya modificada genéticamente demostrando que el método PCR en tiempo real es confiable y puede usarse para determinar el contenido de soya en alimentos procesados por calentamiento de aproximadamente 100°C.

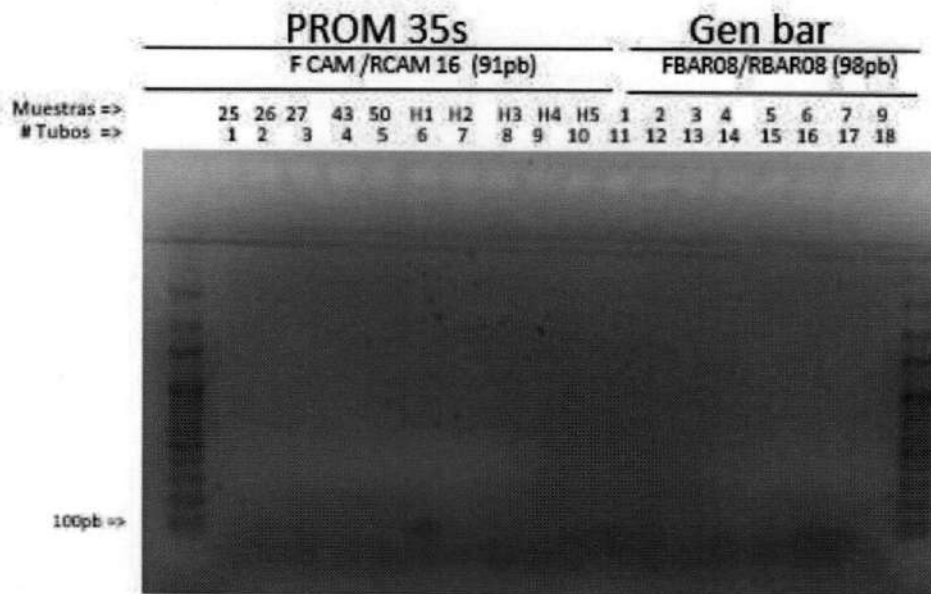


Figura 12. Productos de amplificación para el promotor CAMV35S y el gen bar por PCR convencional.

Para comprobar los resultados obtenidos por la técnica PCR en tiempo real se utilizó el programa Geneious X para comparar la secuencia obtenida de la muestra con la secuencia transgénica en el banco de datos del Gene Bank demostrando su correspondencia con el elementos transgénico.

La **Figura 13** muestra el producto de secuenciación de la reacción M55-P56 (Formato ab.1) y su correspondencia con el elemento transgénico promotor CAM35S. Las muestras secuenciadas con el código M55 corresponde a la muestra H1 (hoja de maíz) siendo el partidor P57 el FCAM16 y la muestra secuenciada con el código M56 corresponde a la muestra H5 (hoja de arroz) y el partidor P56 es el RCAM16. Cabe destacar que el elemento transgénico promotor CAMV35S, es derivado de la secuencia X04879.1. Esta secuencia es una construcción sintética del CaMV en el vector plásmido pMON273 (petunia transgénica). La secuencia es un ADN lineal de 354 pb, cabe destacar que para su construcción se usó un casete que contenía la secuencia codificante de neomicina fosfotransferasa (tipo II) seguida de la región no traducida 3 'de nopalina sintasa (Sanders et al., 1987).

En la **Figura 14** se observa el producto de secuenciación de la reacción M66_P78 en formato ab.1. El diagrama muestra la distribución de los partidores diseñados para detectar el elemento transgénico (t-NOS). La muestra secuenciada con el código M66 corresponde a la muestra 26 (muestra de cornflake) y el partidor P78 corresponde al RNOS18, demostrando de esta forma la coincidencia con esta secuencia.

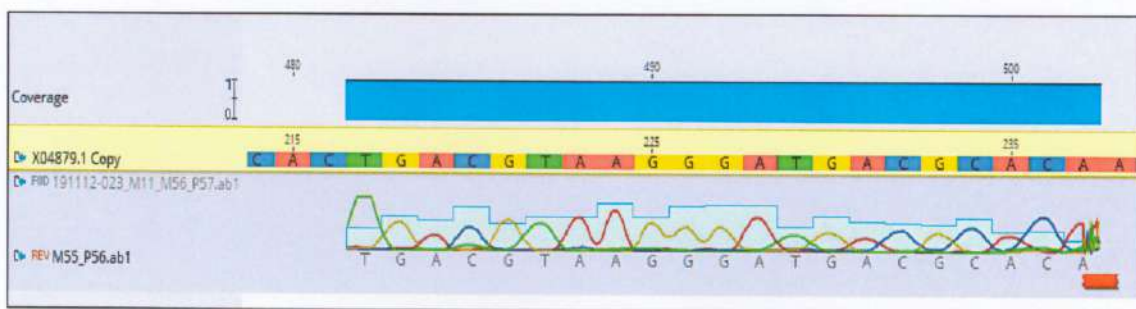


Figura 13. Producto de secuenciación de la reacción M55-P56 (Formato ab.1) y su correspondencia con el elemento transgénico promotor CAMV35S.

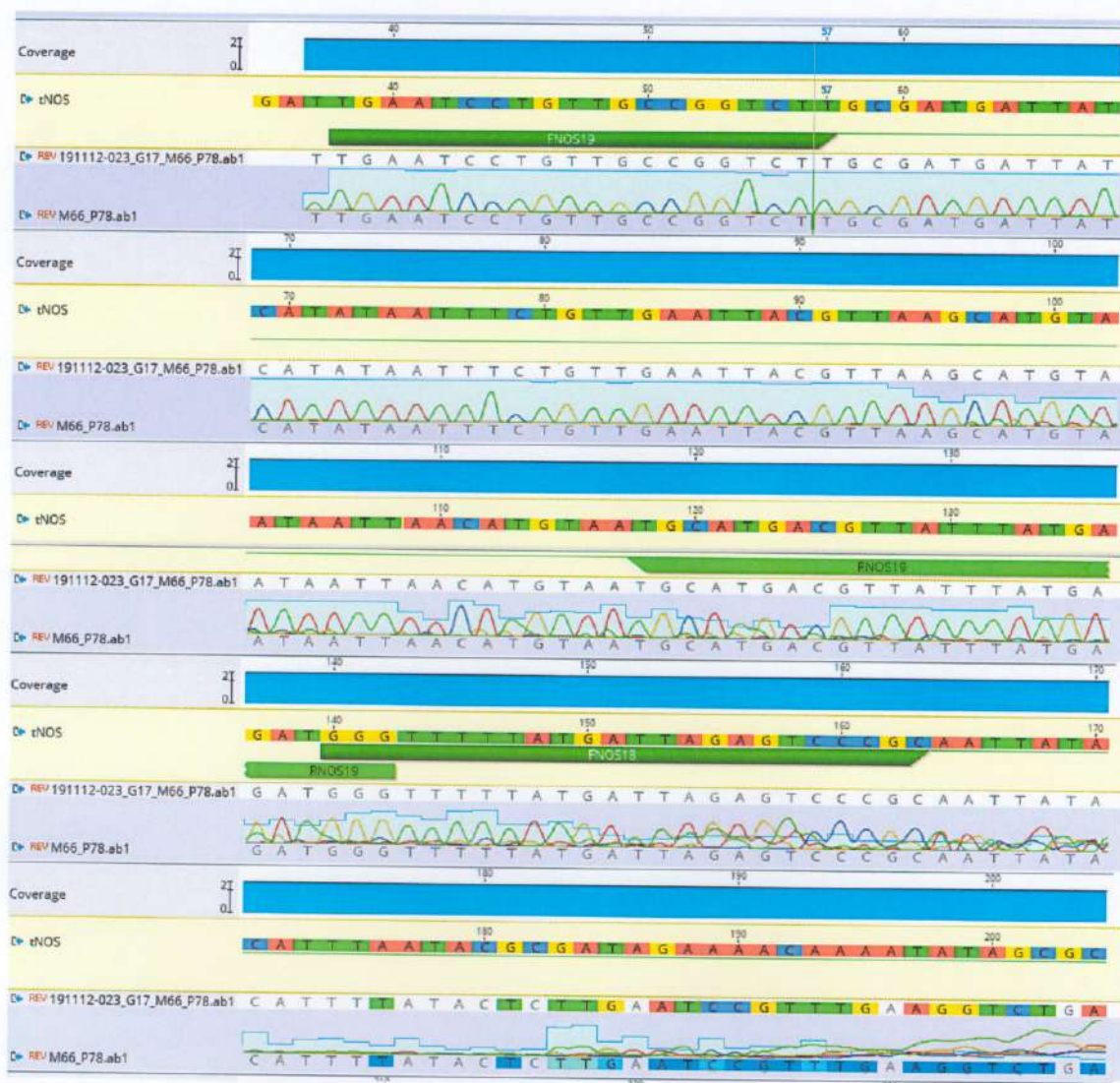


Figura 14. Resultados obtenidos por secuenciación alineados con la secuencia del t-NOS

Se demostró que la técnica de PCR en tiempo real puede utilizarse para detectar la presencia de trazas de material genéticamente modificado en muestras reales, logrando reducir los resultados falsos negativos y los resultados de la secuenciación lo confirman.

Conclusiones

Se logró aislar y cuantificar ADN de buena calidad y cantidad aceptable para realizar el análisis de PCR en tiempo real, a partir de alimentos tipo granos y procesados.

Se identificó la presencia de elementos transgénicos en el 50,9% de las muestras analizadas utilizando la qRT-PCR. De estas muestras el 9,4% de las muestras resultaron positivas un para el promotor CaMV35S (5/53). La mayor parte de las muestras positivas para dicho promotor consistían en productos que contenían maíz como cornflakes, tortillas de maíz, y harina de maíz. De igual forma se observó que el 37,7% (20/53) de las muestras dieron positivas para el terminador t-NOS. Así mismo, se observa que las muestras que presentaron mayor coincidencia con el t-NOS correspondían a las muestras de aceite y cornflakes hechos a base de soya y maíz. Con relación a los demás genes transgénicos se detectaron en las siguientes proporciones en los alimentos: bar 39,6% (21/53), pat 3,8% (2/53), cry1Ab 1,9 % (1/53). Siendo el gen bar y el terminador t-NOS los que estuvieron presentes con mayor frecuencia en las muestras de alimentos.

Se identificaron los elementos transgénicos en alimentos como cereales, aceites, fórmulas infantiles, leche de soya en polvo, tortillas de maíz, harina de maíz y no se encontraron estos elementos transgénicos en alimentos como galletas, proteína de soya texturizada y salchichas de soya.

La metodología de PCR en tiempo real, desarrollada en este estudio, empleando partidores específicos para la detección de elementos transgénicos, constituye una herramienta rápida, sensible y fiable que puede ser empleada para el control del etiquetado de alimentos transgénicos en nuestro país.

La secuenciación de Sanger permitió comprobar la presencia de elementos transgénicos en las muestras que dieron positivo por QRT-PCR.

El hecho de que algunas muestras que resultaron positiva para la presencia de las secuencia blanco en la técnica de QRT-PCR y no pudieron ser definidas mediante PCR convencional, confirma que a través de la técnica de PCR en tiempo real, se pueden detectar elementos transgénicos en ADN altamente segmentado, como en

el obtenido de alimentos muy procesados. debido a que es mucho más sensible que la técnica de PCR convencional.

Recomendaciones

-Para lograr implementar la ley de etiquetado de OGM en Panamá, se requiere la construcción y equipamiento de un laboratorio de referencia en análisis de OGM, que se dedique a evaluar el contenido de transgénicos, para garantizar un etiquetado correcto y adecuado de los alimentos que se comercializan en el mercado nacional.

- Se debe elaborar un plan de monitoreo de secuencias transgénicas en cultivos y productos procesados. Para ello se debe establecer un banco de datos con todos los resultados de los análisis de OGM de productos nacionales e importados, con el fin de verificar que las etiquetas cumplen con el contenido que especifican.

-Es imperativo realizar más estudios de investigación sobre el tema de transgénicos en nuestro país, para detectar si el límite de material OGM, establecido por la regulación sobre alimentos y piensos OGM, se ha extralimitado, esto es importante sobre todo si se desea evaluar los efectos que produce su consumo en el ser humano a largo plazo.

-En Panamá falta diseñar un manual de protocolo de medición de OGM, tomando de referencia las sugerencias de la OMS y países de la Unión Europea que sí poseen manuales de protocolo, pero tomando en cuenta las limitaciones y el entorno en que vivimos.

Referencias bibliográficas

- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2014). PCR en tiempo real. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 175-202.
- Ahmed, F. E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *TRENDS BIOTECHNOL*, 20(5), 215-223.
- Ahatović, A., Ljekperić, E., Nuhanović, M., & Durmić-Pašić, A. (2018). Screening for GMO in fermented soy sauce. *Genetics & Applications*, 1(1), 33-36. doi:10.31383/ga.vol1iss1pp33-36.
- Akhtar, A., Rizvi, Z., Irfan, M., Maqbool, A., Bashir, A. y Malik, KA (2020). Evaluación del riesgo bioquímico y morfológico del trigo transgénico con bioaccesibilidad mejorada de hierro y zinc. *J CEREAL SCI*, 91 , 102881.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. D., Lewis, J., Raff, M., ... & Walter, P. (2013). *Essential cell biology*. Garland Science.
- Alipour, M., Jalili, S., Shirzad, H., Dezfouli, EA, Fouani, MH, Sadeghan, AA, ... y Hosseinkhani, S. (2020). Desarrollo de un grupo de átomos de Ag de emisión dual para la detección de organismos modificados genéticamente. *Microchimica Acta* , 187 (11), 1-12.
- Alvarado, M. F., Chavarría, T., Leiva, B., & Mora, J. J. (2019). Producción de proteínas recombinantes a partir de animales transgénicos: Sistemas y aplicaciones. *Revista Tecnología en Marcha*, pág-133.
- Angers, A., Petrillo, M., Bonfini, L., Gatto, F., Rosa, S., Patak, A., & Kreysa, J. (2014). JRC GMO-Matrix: a web application to support Genetically Modified Organisms detection strategies. *BMC bioinformatics*, 15(1), 417.
- Angulo, N. (2010). Manipulación Genética de los alimentos. Controversias Bioéticas para la Salud Humana. *Comunidad y Salud*, 8(2), 69-76.
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., & Van Den Eede, G. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *EUR FOOD RES TECHNOL*, 214(1), 3-26.
- Arikawa, E., Sun, Y., Wang, J., Zhou, Q., Ning, B., Dial, S. L., ... & Yang, J. (2008). Cross-platform comparison of SYBR® Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC genomics*, 9(1), 328.

- Arleo, M., Benavente, P., Cardozo, V., Katz, A., Vazquez, S., Da Silva, A., ... & Debat, C. M. (2020). Gmo labeling in food products in montevideo, uruguay. *bioRxiv*.
- Artola, J. M. I., Villamonte, G., & Molfino, H. M. G. (2017). Transfección de ADN a células de animales como herramientas utilizadas en biotecnología animal. *The Biologist*, 13(1).
- Arun, Ö. Ö., Yılmaz, F., & Muratoğlu, K. (2013). PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. *FOOD CONTROL*, 32(2), 525-531.
- Avsar, B., Sadeghi, S., Turkeç, A., & Lucas, S. J. (2020). Identification and quantitation of genetically modified (GM) ingredients in maize, rice, soybean and wheat-containing retail foods and feeds in Turkey. *Journal of food science and technology*, 57(2), 787-793.
- Azizi, A., Sharifan, A., & Emtiazjoo, M. (2020). Differential detection and identification of transgenic tomato *Solanum Lycopersicum* by Multiplex PCR technique in Tehran. *Journal of Food Technology and Nutrition*.
- Bak, A., & Emerson, J. B. (2020). Cauliflower mosaic virus (CaMV) biology, management, and relevance to GM plant detection for sustainable organic agriculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 21.
- Baghbani, A., Poureisa, M., Alekajbaf, H., Borz, R. K., & Khodadadi, K. (2021). Current Status of Genetically Modified Crops in Iran and the world: Overview of Production and Consumption Challenges.
- Bagwan, JD, SJ Patil, AS Mane, VV Kadam y S. Vichare. (2010). Cultivos genéticamente modificados: Alimentos del futuro. *Intl. J de Adv Biotech and Research*. 1 (1): 21-30.
- Balta, A., Blanco, V., & Baró, J. (2012). Alimentos transgénicos: la realidad no siempre supera a la ficción.
- Barbuceanu, F., Zybaczynski, I., IONELA, D., DUMITRESCU, G. P., & Baraitareanu, S. (2021). Detection of genetically modified organisms in soy feed and food in Romania. *ROMANIAN BIOTECHNOLOGICAL LETTERS*, 26(1), 2223-2229.
- Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Vandermassen, E. et al. Four new SYBR®Green qPCR screening methods for the detection of Roundup Ready®, LibertyLink®, and CryIAb traits in genetically modified products. *Eur Food Res Technol* 234, 13–23 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1605-7>.

- Barbau-Piednoir, E., Stragier, P., Roosens, N. *et al.* Inter-laboratory Testing of GMO Detection by Combinatory SYBR®Green PCR Screening (CoSYPS). *Food Anal. Methods* 7, 1719–1728 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9837-3>.
- Barfoot, P. y Brookes, G. (2014). "Key global environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2012". *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 5(2): 1-12.
- Barrantes, R. C. (2016). El derecho a la información de los consumidores: el caso de la falta de etiquetado de los alimentos transgénicos.
- Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., & Hardin, J. (2007). *El mundo de la célula* (No. 574.87 B396m). Madrid, ES: Pearson Educación.
- Benavides, F. J., & Guénet, J. L. (2003). La transgénesis y la clonación en los roedores de laboratorio. *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*. Coord. de Ed. Universidad de Alcalá. Madrid. España, 228-229.
- Bener, L., Ersal, M., & Yıldız, B. İ. (2019). The Comparison of Various Real Time PCR Chemistries Used in Detection and Quantification of Genetically Modified Organisms. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(sp1), 133-137.
- Benoit, M., Drost, HG, Catoni, M., Gouil, Q., Lopez-Gomollon, S., Baulcombe, D. y Paszkowski, J. (2019). Regulación ambiental y epigenética de los retrotransposones Rider en tomate. *Genética PLoS*, 15 (9), e1008370.
- Berdal, K, & Holst-Jensen, A. (2001). Roundup Ready® soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *EUR FOOD RES TECHNOL*, 213(6), 432-438.
- Bolivar, A., Rojas, A., & Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en biomedicina*, 3(1), 25-33.
- Bogani, P., Minunni, M., Spiriti, M. M., Zavaglia, M., Tombelli, S., Buiatti, M., & Mascini, M. (2009). Transgenes monitoring in an industrial soybean processing chain by DNA-based conventional approaches and biosensors. *FOOD CHEM*, 113(2), 658-664.
- Bogdanove, A. J., Bohm, A., Miller, J. C., Morgan, R. D., & Stoddard, B. L. (2018). Engineering altered protein–DNA recognition specificity. *NUCLEIC ACIDS RES* 46(10), 4845–4871. <https://doi.org/10.1093/nar/gky289>.

- Bonfini, L., Van den Bulcke, M. H., Mazzara, M., Ben E., Patak, A. (2012). GMOMETHODS: The European Union database of reference methods for GMO analysis, *Journal of AOAC International* 95(6):1713-1719.
- Brara, Z., Costa, J., Villa, C., Grazina, L., Bitam, A., & Mafra, I. (2020). Surveying genetically modified maize in foods marketed in Algeria. *Food Control*, 109, 106928.
- Bravo, E. Transgénicos en Panamá. (2011).
- Bravo, E. (2015). Transgénicos en Panamá. GRAIN, WA, USA. <https://www.grain.org/article/entries/5167-transgenicos-enpanama> (consultado Sept 30. 2018).
- Brown, T. L., LeMay Jr, H. E., Bursten, B. E., & Burdge, J. R. (2004). *Química: la ciencia central*. Pearson educación.
- Bustin, S. A. (2005). PCR en tiempo real. *Enciclopedia de genómica y proteómica diagnóstica*, 10 (1), 117-1.
- Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular detection and quantification*, 14, 19-28.
- Campos, M. A. R. (2014). Los alimentos transgénicos, impacto de una realidad peligrosa y principio de una muerte lenta a largo plazo. *Revista Enfermería A la Vanguardia*, 1(2), 71.
- Camilo C, Leite D, Silva A, Menezes I, Coutinho H, Costa J. Lipid vesicles: Applications, principal components and methods used in their formulations: A review. *Acta biol. Colomb.* 2020;25(2):339-352. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n2.74830>
- Carrizo, C., & Berger, M. S. (2014). Luchas contra los pilares de los agronegocios en Argentina: transgénicos, agrotóxicos y CONABIA.
- Cárdenas, L. N. (2011). Detección y ensayo de los organismos genéticamente modificados. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 21(2), 293-302.
- Carvajal, P., Ureña, H., Umaña, J., Sancho, C., Solano, F., Arleo, M., ... & Umaña, R. (2017). Detección molecular de secuencias de ADN transgénico en alimentos de consumo humano y animal en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 41(1), 53-68.
- Castaño, A. (2017). Consideraciones sobre el etiquetado de los alimentos derivados de cultivos genéticamente modificados-OGM. *Mexican journal of biotechnology*, 2(2), 53-64.

Castillo, Silvana (2017) Determinación de proteínas transgénicas en cereales para el desayuno de maíz etiquetado como libres de OGM. Maestría thesis, Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.

Castro, F. A., Rodríguez, O. E., Guzmán, F., López, B. S., Piétrement, O., Ayache, J., ... & Ruiz, E. (2017). Nuevos materiales biohíbridos como nano-portadores de ácidos nucleicos, y sus aplicaciones biotecnológicas. *Biotecnología Aplicada*, 34(3), 3511-3514.

Cavagnari, B. M. (2010). Generación de animales transgénicos: Regulación de la expresión genética. *Archivos argentinos de pediatría*, 108(5), 438-444.

Center for food Safety,(2020) Demanda desafía el etiquetado de alimentos transgénicos de bioingeniería. Recuperado de https://www.centerforfoodsafety.org/files/gmo-labeling-complaint_53278.pdf.

Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.), Centro Nacional de Información Biotecnológica; [1988] – [citado el 26 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Chai, W. Y., Chu, P. C., Tsai, M. Y., Lin, Y. C., Wang, J. J., Wei, K. C., ... & Liu, H. L. (2014). Magnetic-resonance imaging for kinetic analysis of permeability changes during focused ultrasound-induced blood–brain barrier opening and brain drug delivery. *J CONTROL RELEASE*, 192, 1-9.

Chen, M., Yan, T., Shen, Q., Lu, X., Pan, Q., Huang, Y., ... & Lv, Z. (2017). Glandular Tricome-Specific WRKY 1 promotes artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *New Phytologist*, 214(1), 304-316.

Challiyil, P., Ilves, H., Kazakov, S. A., Howard, S. J., Johnston, B. H., & Fagan, J. (2020). A Real-Time Quantitative PCR Method Specific for Detection and Quantification of the First Commercialized Genome-Edited Plant. *FOODS*, 9(9), 1245.

Chaouachi, M., Nabi, N., Hafsa, AB, Zellama, MS, Skhiri, F. y Saïd, K. (2013). Seguimiento de alimentos y piensos modificados genéticamente en el mercado tunecino mediante PCR cualitativa y cuantitativa en tiempo real. *Ciencia de los alimentos y biotecnología*, 22 (4), 1161-1170.

CIISB. (2020). Centro de Intercambio de Información Sobre Bioseguridad de Panamá. Solicitudes. Recuperado de <https://bioseguridad.gob.pa/solicitudes>.

Clemente, T. E., y Cahoon, E. B. (2009). Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content. *PLANT PHYSIOL*, 151(3), 1030-1040.

- Coello, R. P., Justo, J. P., Mendoza, A. F., & Ordoñez, E. S. (2017). Comparison of three DNA extraction methods for the detection and quantification of GMO in Ecuadorian manufactured food. *BMC research notes*, 10(1), 1-7.
- Conceição, F. R., Moreira, Â. N., & Binsfeld, P. C. (2006). Detection and quantification of genetically modified organisms in food and food ingredients.
- Corona, B, Uffo, O. y Martínez, S.(2006).Detección de organismos genéticamente modificados (OGM) en la cadena alimentaria.
- Corona, B., Martínez, S. (2007). Algunos conceptos relacionados con los organismos genéticamente modificados (OGMS). *Revista de Salud Animal*, 29(1), 1-7.
- Coronado, P. P. C., & Cárdenas, G. A. M. (2020). Elaboración de salsa de soya natural y la influencia de las enzimas en su producción. *Alpha Centauri*, 1(2), 42-50.
- Costa, T. E. M. M., & Marin, V. A. (2011). Rotulagem de alimentos que contém Organismos Geneticamente Modificados: políticas internacionais e Legislação no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(8), 3571-3582.
- Da Silva, F. R., & Yuffá, A. M. (2004). Efecto del herbicida glufosinato de amonio en diferentes explantes de Coffea arabica cv. Catimor. *PLANT MOL BIO*, 55, 211-217.
- Debode, F., Marien, A., Janssen, É., Bragard, C., & Berben, G. (2017). The influence of amplicon length on real-time PCR results. *Base*.
- Debode, F., Hulin, J., Charloteaux, B. *et al.* (2019). Detection and identification of transgenic events by next generation sequencing combined with enrichment technologies. *SCI REP* 9, 15595 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51668-x>
- De Guglielmo C, Z. M., & Fernandez Da Silva, R. (2016). Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 119-128.
- de Mello Brandão, H., Munk, M., de Carvalho, B. C., de Sá Guimarães, A., Carvalho, W. A., Gern, J. C., & Camargo, L. S. A. (2016). Carbon Nanotubes as a DNA Delivery Agent for Generation of Genetically Modified Mammals Embryos. In *Bioengineering Applications of Carbon Nanostructures* (pp. 31-56). Springer, Cham.
- Deng, Y., Wu, J., Tu, K., Xu, H., Ma, L., Chen, J., & Wang, J. (2020). Preparation of DNA-Based Biosensor for Electrochemically Identification of Transgenic Soybean. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ELECTROCHEMICAL SCIENCE*, 15(4), 4556-4566.
- de Vos CJ, Swanenburg M. Health effects of feedinggenetically modified (GM) crops to livestock animals: Areview. *FOOD CHEM TOXICOL*. 2018 jul;117:3–12.

Díaz , C., & Chaparro, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49-61. <https://doi.org/10.31910/rudca.v15.n1.2012.802>

Díaz, L., & Galindo, I. (2014). Detección e identificación de eventos asociados a organismos vivos modificados en semillas de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela empleando métodos de inmunoensayo y análisis por PCR. *Revista de la Facultad de Agronomía (UCV)*, 40, 37-49.

Dzięgiel, N. (2016). Nanoparticles as a Tool for Transfection and Transgenesis – a Review, *Annals of Animal Science*, 16(1), 53-64. doi: <https://doi.org/10.1515/aoas-2015-0077>

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. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 17.4.2002, L106/1.

Duan, Y., Pi, Y., Li, C., & Jiang, K.(2021). An optimized procedure for detection of genetically modified DNA in refined vegetable oils. *Food Science and Biotechnology*, 1-7.

Eischeid, A. C. (2011). SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC research notes*, 4(1), 263.

Elsanhoty, R. M., Ramadan, M. F., & Jany, K. D. (2011). DNA extraction methods for detecting genetically modified foods: A comparative study. *FOOD CHEM*, 126(4), 1883-1889.

Ema, M., Kobayashi, N., Naya, M., Hanai, S., & Nakanishi, J. (2010). Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *REPROD TOXICOL* , 30(3), 343-352.

Embajada de Estados Unidos (2019). Export.gov. Panama - Market Overview Recuperado de https://www.export.gov/article?series=a0pt0000000PAueAAG&type=Country_Commercial__kav.

Ewen SW, Pusztai A. (1999). Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine. *LANCET*.;354(9187):1353-1354. doi:10.1016/S0140-6736(98)05860-7.

FDA, (2020a). Biotecnología Agrícola. Recuperado de <https://www.fda.gov/food/agricultural-biotechnology/biotecnologia-agricola>

FDA ,(2020b).Tipos de Métodos de Modificación Genética para cultivos. Recuperado de <https://www.fda.gov/media/142243/download>.

FAO,(2000).Los OGM y la Salud Humana Recuperado de <http://www.fao.org/3/X9602s/x9602s06.htm#TopOfPage>. Visitado el 10 de octubre del 2020,10:00p:m.

FAO (2008). Organismos vivos modificados: nuevas directrices para la evaluación de riesgos Recuperado de <http://www.fao.org/newsroom/en/news/2004/43684/index.html#:~:text=%22Living%20modified%20organisms%22%20are%20any,of%20plants%20and%20therefor%20LMOs>.

FAO,(2004). Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación. Recuperado de <http://www.fao.org/3/y2775s/y2775s00.htm>. Visitado el 15 de octubre del 2019, 10:10 a:m.

FAO (2009). 2050 Un tercio más de bocas que alimentar. Recuperado de <http://www.fao.org/news/story/es/item/35675/icode/>.

FAO (2012). “Autorizada la siembra de maíz transgénico en Panamá”.<http://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/510668/>.

FAO (2021). Sistemas alimentarios. Recuperado de <http://www.fao.org/food-systems/es/>.

FAO, F., OMS, P., & Unicef. (2018). El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2018. *Fomentando la resiliencia climática en aras de la seguridad alimentaria y nutrición*. Roma: FAO.

FAO/WHO(2020a). What is the Codex Alimentarius?.Recuperado de <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh>. Visitado el 10 de octubre del 2020,12:30a:m.

FAO/WHO(2020b).The role of Codex in Biotechnology. Recuperado de <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/thematicareas/biotechnology/en/> Visitado el 11 de octubre del 2020.

FAO/WHO(2020c).Recopilación de textos del Codex pertinentes al etiquetado de alimentos derivados de la biotecnología moderna. CAC/GL 76-2011. Recuperado de:http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B76-2011%252FCXG_076s.pdf. Visitado el 11 de octubre del 2020.

FAO/WHO (2020d). Principios para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos CAC/GL 44-2003. Recuperado de ao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B44-2003%252FCXG_044s.pdf.

Fares, N. H., & El-Sayed, A. K. (1998). Fine structural changes in the ileum of mice fed on δ -endotoxin-treated potatoes and transgenic potatoes. *NAT TOXINS*, 6(6), 219-233.

Flores YA; Herrera, RR; Aguilar, CN; Carlos, J; Esquivel, C. 2007. Nuevos métodos para la detección de residuos de organismos genéticamente modificados en alimentos basados en el ADN. *BioTecnología* 11(2):28-36.

Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2014). *Real-Time PCR. Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 8(1), 10.3.1–10.3.40. doi:10.1002/9780470089941.et1003s08.

Fraiture, M. A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D., & Roosens, N. H. (2015). Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions. *BioMed research international*, 2015, 1-22.

Fu, W., Zhu, P., Qu, M., Zhi, W., Zhang, Y., Li, F., & Zhu, S. (2021). Evaluation on reprogramed biological processes in transgenic maize varieties using transcriptomics and metabolomics. *Scientific Reports*, 11(1), 1-13.

García, J. R. (2014). Cultivos Transgénicos y su Contexto en Panamá. *Revista Plus Economía*, 2(2), 15-20.

García, T., Martín, R., Morales, P., Haza, A. I., Anguita, G., González, I., ... & Hernández, P. E. (1994). Production of a horse-specific monoclonal antibody and detection of horse meat in raw meat mixtures by an indirect ELISA. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66(3), 411-415

García-Segura, J. M., Gavilanes, J. G., Martínez del Pozo, A., Montero, F., Oñaderra, M., & Vivanco, F. (1996). *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. Síntesis

Garcinuño, Á. G. (2013). Beneficios y perjuicios de la Ingeniería Genética en agricultura. *Cuadernos del Tomás*, (5), 259-282.

Gasparic, M. B., Tengs, T., La Paz, J. L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T. & 77 Gruden, K. (2010). Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *ANAL BIOANAL CHEM*, 396(6), 2023–2029

Geier T., K. Eimert, R. Scherer, C. Nickel (2008). Production and rooting behaviour of rolBtransgenic plants of grape rootstock 'Richter 110' (*Vitis berlandieri* × *V. rupestris*) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94 (3): 269-280.

Girardi, F. A. (2015). *Toxicidade de nanotubos de carbono de parede simples funcionalizados com polietileno glicol em embriões de zebrafish (Danio rerio)* (Master's thesis).

Gómez, J. A. M., Osuna, M. A. I., Plascencia, G. Y., & de la Barca, A. M. C. (2003). Detección por PCR de un transgen en productos de soya utilizados para formular alimentos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26(4), 263-269.

Gomez M. (2020). Evidence of Food Safety in relation to Cry proteins in genetically modified foods. *Salud UIS* ; 440-449. doi: <https://doi.org/10.18273/revsal.v52n4-2020011>.

González Santiago, J., Trujillo Rascón G, (2012) Organismos Transgénicos de Tercera Generación.

Grammenos, A., Paramithiotis, S., Drosinos, E. H., & Trafialek, J. (2021). Labeling accuracy and detection of DNA sequences originating from GMOs in meat products commercially available in Greece. *LWT*, 137, 110420.

Grazina, L., Plácido, A., Costa, J., Fernandes, T. J., Oliveira, M. B. P., & Mafra, I. (2017). Tracing two Roundup Ready™ soybean lines (GTS 40-3-2 and MON89788) in foods commercialised in Portugal. *FOOD CONTROL*, 73, 1053-1060.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), pdb-top095109.

Griffiths, K., Australian Government Analytical Laboratories, Partis, L., Croan, D., Wang, N., & Emslie, K. (2002). *Review of technologies for detecting genetically modified materials in commodities and food*. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry-Australia.

Gryson N, Messens K, Dewettinck K (2004) Influence of different oil refining parameters and sampling size on the detection of genetically modified DNA in soybean oil. *JAOC* 81:231–234

Gryson, N. (2010). Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *ANAL BIOANAL CHEM*, 396(6), 2003-2022.

Guerrero, J. E. L., Rojas, A. F. V., Cortés, M. M. A., & Fernández, L. F. C. (2018). Panorama general de los organismos genéticamente modificados en Colombia y en el mundo: Capacidad nacional de detección. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 101-116.

- Guleria, P., & Kumar, V. (2021). GMO to Eradicate Malnutrition: Current Status. *Current Nutrition & Food Science*, 17(1), 4-10.
- Guo, M., Ye, J., Gao, D., Xu, N., & Yang, J. (2019). Agrobacterium-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy, *BIOTECHNOL ADV* .37(1), 259-270.
- Guoliang, L. I., Lixin, Y. U. E., Fei, L. I., Zhang, S., Zhang, H., Wei, Q. I. A. N., ... & Rifei, S. U. N. (2018). Research progress on Agrobacterium tumefaciens-based transgenic technology in Brassica rapa. *Horticultural Plant Journal*, 4(3), 126-132.
- Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J. L., & Rodríguez, B. (2003). Mejoramiento genético vegetal in vitro. *e-Gnosis*, (1),0.
- Gutiérrez, L. E., Castillo, L. C., Gómez, B. E., & Acatzi, A. I. (2015). Cuantificación de maíz genéticamente modificado mediante las técnicas de qPCR y dPCR. *Agrociencia*, 49(4), 373-394.
- Haddadi, F., Abd Aziz, M., Abdullah, S. N. A., Tan, S. G., & Kamaladini, H. (2015). An efficient Agrobacterium-mediated transformation of strawberry cv. Camarosa by a dual plasmid system. *MOLECULES*, 20(3), 3647-3666.
- Hafsa, A. B., Nabi, N., Zellama, M. S., Said, K., & Chaouachi, M. (2016). A new specific reference gene based on growth hormone gene (GH1) used for detection and relative quantification of Aquadvantage® GM salmon (*Salmo salar* L.) in food products. *Food chemistry*, 190, 1040-1045.
- Hartman. 2014. Special Report: Perception, Knowledge and Labelling: The Hartman Group Inc. Washington. 52p.
- Hartung, F., & Schiemann, J. (2014). Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *The Plant Journal*, 78(5), 742-752.
- Haruyama N, Cho A, Kulkarni AB. Descripción general: ingeniería de construcciones transgénicas y ratones. *Curr Protoc.CELL BIOL*. 2009; Capítulo 19: Unidad-19.10. doi: 10.1002 / 0471143030.cb1910s42.
- Hawkins SFC, Guest PC (2017). Análisis multiplex mediante PCR cuantitativa en tiempo real. En: Guest P. (eds) *Multiplex Biomarker Techniques. Methods in Molecular Biology*, vol. 1546. Humana Press, Nueva York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8_8.
- Heredia, I. J., Pérez, C. Q., Durán, F. O., Vallejo, E. M. P., Hernández, M. G., & Vega, J. L. (2020). Análisis de curvas de fusión de alta resolución para la tipificación de la mutación de la abiotrofia cerebelar equina Título breve:: Abiotrofia cerebelar

equina mediante HRM. *Sanidad militar: revista de sanidad de las Fuerzas Armadas de España*, 76(1), 8-12.

Hernández, M., Duplan, M. N., Berthier, G., Vaïtilingom, M., Hauser, W., Freyer, R., & Bertheau, Y. (2004). Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(15), 4632-4637.

Holme, I. B., Wendt, T., & Holm, P. B. (2013). Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*, 11(4), 395-407.

Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., de Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Hougs, L., ... & Wulff, D. (2012). Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *BIOTECHNOL ADV*, 30(6), 1318-1335.

INEC. Instituto Nacional de Estadística y Censo., (2020a). Panamá en Cifras (2014-2018). Recuperado de <https://www.inec.gob.pa/archivos/P0705547520200131105249Panama%20en%20Cifras.pdf>.

INEC. Instituto Nacional de Estadística y Censo. (2020b). Importación a la República por valor y peso según Principal país de Origen. Recuperado de: https://www.inec.gob.pa/archivos/A053342420200921094810IMPPRINCPAISES_ABRILAJUNIO2020.pdf

InfOGM .Vigilancia Ciudadana de Información sobre transgénicos y semillas. (2017). Mapa sobre las leyes de etiquetado de OGM en el mundo. Francia. Recuperado de <https://www.infogm.org/spip.php?page=carte&theme=etiquetage>. Visitado el 11 de octubre del 2020.

InfOGM.(2020) Etiquetado e información al público. <https://www.infogm.org/-etiquetage-transparence-information-du-public-sur-les-OGM-> Visitado el 12 de octubre del 2020.

Innis, M. S., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., & Brown, M. A. (1992). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. 1988. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24, 6-10.

International Organization for Standardization. ISO 21569:2005. Productos alimenticios. Métodos de análisis para la detección de organismos modificados genéticamente y productos derivados. Métodos cualitativos basados en ácidos nucleicos.

ISAAA. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. (2018) Global status of commercialized biotech/ GM crops: 2018. Brief N° 54. ISAAA, NY,

USA. <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/54/default.asp> (accessed Oct. 15, 2019).

ISAAA .Informe ISAAA:55-2019 (2019).Recuperado de <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/55/executivesummary/default.asp>.

Jacobsen, E., & Schouten, H. J. (2009). Cisgenesis: an important sub-invention for traditional plant breeding companies. *Euphytica*, 170(1), 235-247.

Jaworski, J. P. SARS-CoV-2, COVID-19 y vacunación en la República Argentina: conceptos básicos.

Jiang, N., Visa, S., Wu, S., & van der Knaap, E. (2012). Rider transposon insertion and phenotypic change in tomato. In *Plant Transposable Elements* (pp. 297-312). Springer, Berlin, Heidelberg.

Jiménez Peralta, M. (2003). Detección de alimentos y cultivos modificados genéticamente. Tecnológico de Costa Rica.

Jurat-Fuentes, J. L., Heckel, D. G., & Ferré, J. (2021). Mechanisms of Resistance to Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 66, 121-140.

Kakihara, Y., Matsufuji, H., Chino, M., & Yamagata, K. (2007). Detection of recombinant DNA of genetically modified (GM) soybeans in heat-treated GM soybeans and commercial natto. *FOOD CONTROL*, 18(10), 1289-1294.

Kang, T. S. (2019). Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 574-585.

Karalis, D. T., Karalis, T., Karalis, S., & Kleisiari, A. S. (2020). Genetically Modified Products, Perspectives and Challenges. *Cureus*, 12(3), e7306. <https://doi.org/10.7759/cureus.7306>

Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, SMP y Tuteja, N. (2016). La herramienta de edición del genoma CRISPR / Cas: aplicación en la mejora de cultivos. *FRONT PLANT SCI*, 7 , 506.

Kidwell, M. G. (2005). Transposable elements. In *The evolution of the genome* (pp. 165-221). Academic Press.

Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N. y Hirochika, H. (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*, 304(5673), 982-982.

Kok E J, H J M Aarts, A M A Van Hoef, H A Kuiper (2002) DNA methods: critical review of innovative approaches. *J. AOAC Int.* 85:797-800.

- Košir, A. B., Demšar, T., Štebih, D., Žel, J., & Milavec, M. (2019). Digital PCR as an effective tool for GMO quantification in complex matrices. *FOOD CHEM*, 294, 73-78.
- Kramkowska, M., Grzelak, T., & Czyzewska, K. (2013). Benefits and risks associated with genetically modified food products. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(3).
- Larrión, J. (2016). ¿ Qué significa estar bien informado? Retóricas, percepciones y actitudes ante el problema del etiquetado de los alimentos transgénicos. *Revista Española de Investigaciones Sociológicas (REIS)*, 153(1), 43-48.
- Legorreta, M., Martínez, F., Sánchez, F. H., & Zentella, A. (2012). The viral vectors and the transgenesis. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 15(1), 5-14.
- Leimanis, S., Hernandez, M., Fernandez, S., Boyer, F., Burns, M., Bruderer, S., ... & Pla, M. (2006). A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *PLANT MOL BIOL*, 61(1-2), 123-139.
- Li, R., Zhuang, Y., Han, M., Xu, T., & Wu, X. (2013). piggyBac as a high-capacity transgenesis and gene-therapy vector in human cells and mice. *DIS MODEL MECH*, 6(3), 828-833.
- Li, Y., Hao, N., Luo, S., Liu, Q., Sun, L., Qian, J., ... & Wang, K. (2020). Simultaneous detection of TNOS and P35S in transgenic soybean based on magnetic bicolor fluorescent probes. *Talanta*, 212, 120764.
- Lin, C. et al. Dramatic genotypic difference in, and effect of genetic crossing on, tissue culture-induced mobility of retrotransposon Tos17 in rice. *Plant Cell Rep.* 31, 2057–2063 (2012).
- Liu, D., Yang, F., Xiong, F. y Gu, N. (2016). The smart drug delivery system and its clinical potential. *THERANOSTICS*, 6(9), pp.1 306-1323. <http://doi.org/10.7150/thno.14858>.
- Liu, F., Li, K., Zhang, Y., Ding, J., Wen, T., Pei, X., ... & Li, L. (2020). An electrochemical DNA biosensor based on nitrogen-doped graphene nanosheets decorated with gold nanoparticles for genetically modified maize detection. *Microchimica Acta*, 187(10), 1-8.
- Liu, J., Li, Z. Y., Dong, J., & Gao, D. W. (2021). A universal quantification of transgenic soybean event DAS-68416-4 using duplex digital PCR. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(2), 624-630.

- Liu, Y., & Yin, S. (2020). Advance of Multiplex PCR in Rapid Detecting Transgenic Soybean Oil. *American Journal of Plant Sciences*, 11(03), 382.
- Lombardo, L. (2014). Genetic use restriction technologies: a review. *Plant biotechnology journal*, 12(8), 995-1005.
- Lorković, ZJ, Naumann, U., Matzke, AJ y Matzke, M. (2012). Participación de una ATPasa GHKL en la metilación del ADN dirigida por ARN en *Arabidopsis thaliana*. *Biología actual*, 22 (10), 933-938.
- Lusser M., Parisi C., Plan D., Cerezo E. R. (2011). "New plant breeding techniques. State-of-the-art and prospects for commercial development," in JRC Scientific and Technical Reports. (Luxembourg: Publications Office of the European Union;), pp. 1–220. 10.2791/5476.
- Lutz, K. A., Knapp, J. E., & Maliga, P. (2001). Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistance. *PLANT PHYSIOL*, 125(4), 1585-1590.
- McMichael, P. (2021). Political economy of the global food and agriculture system. In *Rethinking Food and Agriculture* (pp. 53-75). Woodhead Publishing.
- Manzanares, C. L. (2018). Electrochemical DNA biosensors and sensing platforms for the detection and quantification of genetically modified soybean in food and feed (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Margarit, E; Reggiardo, MI; Vallejos, RH; Permingeat, HR. 2006. Detection of BT transgenic maize in foodstuffs. *FOOD RES INT*, 39(2):250- 255.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Papathoma, a, Nerantzis, E., Betzios, B., Dourtoglou, V., & Moncany, M. (2004). Qualitative and quantitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food. *FOOD REV INT*, 20(3), 275–296. <http://doi.org/10.1081/lfri-200029418>.
- Marqués, M. M., Baro, M. F., Nicolás, S., & Bayón, Y. (2018). Transgénesis en animales de granja. *Ambiociencias*, (12), 34-49.
- Martins, P. K., Nakayama, T. J., Ribeiro, A. P., da Cunha, B. A. D. B., Nepomuceno, A. L., Harmon, F. G., ... & Molinari, H. B. C. (2015). *Setaria viridis* floral-dip: a simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation method. *Biotechnology reports*, 6, 61-63.
- Meissner, J. M., Toporkiewicz, M., Matuszewicz, L., & Machnicka, B. (2016). Liposomes as non-viral carriers for genetic drugs. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 70, 200-209.
- Mesnage, R., Agapito-Tenfen, S., Vilperte, V. *et al.* Un análisis integrado de múltiples omics del maíz GM tolerante a Roundup NK603 revela alteraciones del

metabolismo causadas por el proceso de transformación. SCI REP. 6, 37855 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep37855>.

Mesnager, R., Arno, M., Séralini, G. *et al.* Transcriptome and metabolome analysis of liver and kidneys of rats chronically fed NK603 Roundup-tolerant genetically modified maize. ENVIRON SCI EUR 29, 6 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12302-017-0105-1>.

Montori, I. F. (2006). Mecanismo de detecció d'organismes genèticament modificats. TECA: Tecnologia i Ciència dels Aliments, 17-24.

Morales Estupiñán, C. (2001). Las nuevas fronteras tecnológicas: promesas, desafíos y amenazas de los transgénicos. Mondal, K., & Raigar, O. P. MOLECULAR CONVICTION BEHIND THE PRODUCTION OF "SUICIDE SEEDS". *Agri-India TODAY*.

Mousavian, S. Z., Safarian, M., Sany, S. B. T., Pasdar, Z., & Rezayi, M. (2018). Advancement in Electrochemical DNA Biosensors for GMO Detection: A Review Study. *Journal of Fasting & Health*, 6(4).

Natarajan, S., Luthria, D., Bae, H., Lakshman, D., & Mitra, A. (2013). Transgenic soybeans and soybean protein analysis: an overview. J AGR FOOD CHEM, 61(48), 11736-11743.

Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). *Real-time PCR detection chemistry. Clinica Chimica Acta*, 439, 231-250. doi:10.1016/j.cca.2014.10.017.

National Center for Biotechnology Information (Internet). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). National Center for Biotechnology Information; (1988) NCBI (Consultado el 2 de abril del 2018). Disponible en :<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Nordlee, J. A., Taylor, S. L., Townsend, J. A., Thomas, L. A., & Bush, R. K. (1996). Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. NEW ENGL J MED , 334(11), 688-692.

Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., & Dugdale, B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. PLANT METHODS, 14(1), 1-14.

Núñez CL. Detección y ensayo de los organismos genéticamente modificados. RCAN. 2011;21(2):293-302.

- O'Brien, J.A., Lummis, S.C. Nano-biostics: a method of biolistic transfection of cells and tissues using a gene gun with novel nanometer-sized projectiles. *BMC Biotechnol* **11**, 66 (2011). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-66>.
- Odell, J. T., Nagy, F., & Chua, N. H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313(6005), 810.
- Ogasawara, T., Arakawa, F., Akiyama, H., Goda, Y., & Ozeki, Y. (2003). Fragmentation of DNAs of processed foods made from genetically modified soybeans. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 10(3), 155-160
- O'Sullivan, M., & Fox, P (1991). Evaluation of microbial chymosin from genetically engineered *Kluyveromyces lactis*. *FOOD BIOTECHNOL* , 5(1), 19-32.
- Ojeda, F. J. P. (2014). Nuevas tecnologías en el control de la seguridad alimentaria. *3c Tecnología: glosas de innovación aplicadas a la pyme*, 3(3), 162-179.
- Oliver, M. J. (2014). Why we need GMO crops in agriculture. *Missouri medicine*, 111(6), 492.
- OMS, (2007). Sobre la Inocuidad, O. D. E.. de los Alimentos Obtenidos de Animales de ADN Recombinante Sede de la Organización Mundial de la Salud Ginebra (Suiza), 26 de febrero–2 de marzo de 2007.
- OMS, (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Italia.; Report No.: ISBN-978-92-79-04831- 9.
- OMS. Enfermedad por el coronavirus de 2019 (COVID-19): seguridad de las vacunas. [https://www.who.int/es/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines-safety](https://www.who.int/es/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines-safety)
- Otero, R. Hernández, D , & Pérez, J. (2020). Production of bovine transgenic embryos by microinjection of a lentiviral vector pre and post fertilization. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 18(1), 64-73.
- Oviedo, K., García, J., Solano, S., Martínez, C., Sancho, C., & Umaña, R. (2020). Detección del promotor 35S mediante PCR tiempo-real: indicador de transgenicidad en alimentos y *Gossypium* sp. *Agronomía Mesoamericana*, 31(1), 209-221.
- Pauli, U; Liniger, M; Zimmermann, A; Schrott, M; Schouwey, B. (2000). Extraction and amplification of DNA from 55 foodstuffs. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 91(5):491-501.
- Paz, M. M., Shou, H., Guo, Z., Zhang, Z., Banerjee, A. K., & Wang, K. (2004). Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *EUPHYTICA*, 136(2), 167-179.

- Peremarti, A., Twyman, R. M., Gómez-Galera, S., Naqvi, S., Farré, G., Sabalza, M., ... & Christou, P. (2010). Promoter diversity in multigene transformation. *PLANT MOL BIOL*, 73, 363-378.
- Phenix, C. P., Togtema, M., Pichardo, S., Zehbe, I., & Curiel, L. (2014). High intensity focused ultrasound technology, its scope and applications in therapy and drug delivery. *J PHARM PHARM SCI*, 17(1), 136-153.
- Potrykus, I. (2001). Golden rice and beyond. *Plant physiology*, 125(3), 1157-1161.
- Prada, J., & Castellanos, J. E. (2011). Real time PCR. Application in dengue studies. *Colombia Médica*, 42(2), 243-258.
- Puchta, H., & Hohn, B. (2010). Breaking news: Plants mutate right on target. *P NATL ACAD SCI USA*, 107(26), 11657-11658..
- Quan, P.-L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *SENSORS*, 18(4), 1271. doi:10.3390/s18041271
- Querci M., Jermini M. Van Den Edde G. (2007). Análisis de la presencia de Organismos Genéticamente Modificados en muestras de alimentos; Manual del participante. Joint Research Centre; Comisión Europea.
- Querci, M., Van den Bulcke, M., Žel, J., Van den Eede, G., & Broll, H. (2010). New approaches in GMO detection. *ANAL BIOANAL CHEM*, 396(6), 1991-2002.
- Qiu X, Wong G, Audet J, Bello A, Fernando L, Alimonti JB, et al. (2014). Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *NATURE*. Oct 2;514(7520):47-53.
- Rabiei, M; Mehdizadeh, M; Rastegar, H; Vahidi, H; Alebouyeh, M. (2013). Detection of genetically modified maize in processed foods sold commercially in Iran by qualitative PCR. *IRAN J PHARM RES*,12(1):25.
- Ramadan, M. F., Elsanhoty, R. M., & Al-Turki, A. I. (2016). Usage of Genetically Modified Foods: The Extent of Genetically Modified Rice, Maize, and Soy Consumption in Saudi Arabia.
- Radonic, L. M. (2011). Nuevas estrategias para la transformación y expresión de genes de interés en girasol (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).
- Rao, Q., & Hsieh, Y. H. P. (2008). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of bovine blood in heat-processed meat and feed. *J FOOD PROTECT*, 71(5), 1000-1006.

- Razzaq, A., Saleem, F., Kanwal, M., Mustafa, G., Yousaf, S., Imran Arshad, H. M., ... Joyia, F. A. (2019). Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox. *INT J MOL SCI*, *20*(16), 4045. doi:10.3390/ijms20164045
- Reyes M, Rozowski, J.,(2003). Alimentos Transgénicos. Escuela de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Ribarits, A., Narendja, F., Stepanek, W., & Hochegger, R. (2021). Detection Methods Fit-for-Purpose in Enforcement Control of Genetically Modified Plants Produced with Novel Genomic Techniques (NGTs). *Agronomy*, *11*(1), 61.
- Ricaño, J., Zavala, E. A., & Ramírez, M. (2014). Silenciamiento génico en plantas: mecanismos moleculares del ARN de interferencia y aplicaciones biotecnológicas. *Revista fitotecnia mexicana*, *37*(4), 339-350.
- Rinaldo, A. R., & Ayliffe, M. (2015). Gene targeting and editing in crop plants: a new era of precision opportunities. *MOL BREEDING*, *35*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0210-z>.
- Robayo, A., Galindo, M. G., Yáñez, L., & Aldama, C. (2018). Medición de la percepción pública de los OGM con una escala tipo Likert. *Agrociencia*, *52*(5), 767-781.
- Rojas, I. R. G., Alonso, J. C. G., & Trujillo, T. (2012). Los alimentos transgénicos y la salud humana. *Mediciego*, *18*(5).
- Salihah, N. T., Hossain, M. M., Lubis, H., & Ahmed, M. U. (2016). Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction. *J FOOD SCI TECH*, *53*(5), 2196-2209.
- Salisu, I. B., Shahid, A. A., Yaqoob, A., Ali, Q., Bajwa, K. S., Rao, A. Q., & Husnain, T. (2017). Molecular approaches for high throughput detection and quantification of genetically modified crops: a review. *FRONT PLANT SCI*, *8*, 1670.
- Salonia, F., Ciacciulli, A., Poles, L., Pappalardo, H. D., La Malfa, S., & Licciardello, C. (2020). New Plant Breeding Techniques in Citrus for the Improvement of Important Agronomic Traits. A Review. *FRONT PLANT SCI*, *11*, 1234. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01234>.
- Sampson, H. A. (2004). Update on food allergy. *J ALLERGY CLIN IMMUN*, *113*(5), 805-819.
- Sánchez A. y Gadea. J, (2014). "Animales transgénicos para la producción de proteínas humanas," *Anales de Veterinaria de Murcia*, *30*, 7-18.

- Sanders PR, Winter JA, Barnason AR, Rogers SG, Fraley RT. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Res.* 1987 Feb 25;15(4):1543-58. doi: 10.1093/nar/15.4.1543. PMID: 3029718; PMCID: PMC340566.
- Sauer, N. J., Narváez-Vásquez, J., Mozoruk, J., Miller, R. B., Warburg, Z. J., Woodward, M. J., ... & Walker, K. A. (2016). Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants. *PLANT PHYSIOL*, 170(4), 1917-1928.
- 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. *Revista argentina de microbiología*, 40(2), 124-140.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *NAT PROTOC*, 3(6), 1101.
- 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), 750-753.
- Schouteten, J. J., Gellynck, X., & De Steur, H. (2018). Consumers' perceptions of GM-free labelled foods: A sensory experiment. *INT J CONSUM STUD*, 42(3), 347-357.
- Seralini, G. (2020). Update on long-term toxicity of agricultural GMOs tolerant to roundup. *ENVIRON SCI EUR* 32, 18
- Seralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M (2014) Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *ENVIRON SCI EUR* , 26:14.
- Sheng Sun, Xiu-Ping Kang, Xiao-Juan Xing, Xiao-Yong Xu, Jiao Cheng, Shao-Wen Zheng & Guo-Ming Xing (2015) *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hezuo 908) with improved efficiency, *BIOTECHNOL BIOTEC EQ*, 29:5, 861-868.
- Singh, S. P., Keller, B., Gruissem, W., & Bhullar, N. K. (2017). Rice Nicotinamine Synthase 2 expression improves dietary iron and zinc levels in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 130(2), 283-292.
- Skipper, K.A., Andersen, P.R., Sharma, N. *et al.* (2013). DNA transposon-based gene vehicles - scenes from an evolutionary drive. *J BIOMED SCI* ,20, 92.

Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS MICROBIOLOGY ECOL*, 67(1), 6-20.

Soares, S., Mafra, I., Amaral, J. S., & Oliveira, M. B. P. (2010). A PCR assay to detect trace amounts of soybean in meat sausages. *INT J FOOD SCI TECH*, 45(12), 2581-2588.

Soga, K., Nakamura, K., Ishigaki, T., Kimata, S., Ohmori, K., Kishine, M., ... & Kondo, K. (2020). Development of a novel method for specific detection of genetically modified Atlantic salmon, AquAdvantage, using real-time polymerase chain reaction. *Food chemistry*, 305, 125426.

Spanea, E., Tsironi, T., Tsakali, E., Batrinou, A., Stefanou, V., Antonopoulos, D., ... & Houhoula, D. (2020). Evaluation of a Real Time PCR Assay Method for the Detection of Genetically Modified Organisms in Food Products. *Journal of Food Research*, 9(2).

Steinberg P, Van der Voet H, Goedhart PW, Kleter G, Kok EJ, Pla M, Nadal A et al (2019) Lack of adverse effects in subchronic and chronic toxicity/ carcinogenicity studies on the glyphosate-resistant genetically modified maize NK603 in Wistar Han RCC rats. *ARCH TOXICOL* 93:1095–1139. [https:// doi.org/10.1007/s00204-019-02400-1](https://doi.org/10.1007/s00204-019-02400-1).

Tartof, S. Y., Slezak, J. M., Fischer, H., Hong, V., Ackerson, B. K., Ranasinghe, O. N., ... & McLaughlin, J. M. (2021). Six-Month Effectiveness of BNT162B2 mRNA COVID-19 Vaccine in a Large US Integrated Health System: A Retrospective Cohort Study.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.

Tengel, C., Schüßler, P., Setzke, E., Balles, J., & Sprenger-Haussels, M. (2001). PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *BIOTECHNIQUES*, 31(2), 426-429.

ThermoFisher Scientific. 2020. Recuperado de <https://www.thermoFisher.com/order/catalog/product/4466336#/4466336>.

Thomas, S. J., Moreira Jr, E. D., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., ... & Jansen, K. U. (2021). Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine through 6 months. *New England Journal of Medicine*.

Tovar, G. N., Maldonado, L. A., & Castillo, M. D. C. G. (2018). Liposomas. Recuperado de <http://www.uaslp.mx/Comunicacion-Social/Documents/Divulgacion/Revista/Quince/229/229-1.pdf>

Trejo, D. L., Rodríguez, E. A., & Rivera, R. F. (2015). Detección de transgenes en Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta Universitaria*, 25(3), 24-39.

Tripathi, L., Tripathi, J. N., & Hughes, J. A. (2005). Agrobacterium-mediated transformation of plantain (*Musa* spp.) cultivar Agbagba. *AFR J BIOTECHNOL* 4(12).

Tsatsakis, A. M., Nawaz, M. A., Tutelyan, V. A., Golokhvast, K. S., Kalantzi, O. I., Chung, D. H., ... & Chung, G. (2017). Impact on environment, ecosystem, diversity and health from culturing and using GMOs as feed and food. *FOOD CHEM TOXICOL*, 107, 108-121.

Tutel'ian, V. A., Kravchenko, L. V., Lashneva, N. V., Avren'Eva, L. I., Guseva, G. V., Elu, S., & Chernysheva, O. N. (1999). Medical and biological evaluation of safety of protein concentrate from genetically-modified soybeans. *Biochemical studies. Voprosy pitaniia*, 68(5-6), 9-12.

Turkec, A. Kazan, H. Baykut, A, y Lucas, S.J (2015). Evaluation of DNA extraction methods in order to monitor genetically modified materials in soy foodstuffs and feeds commercialised in Turkey by multiplex real-time PCR. *J SCI FOOD AGR*, 95(2), 386-392.

UE. Unión Europea (2001). Reglamento (CE) n 2001/18 del Parlamento Europeo y del Consejo del 12 de marzo del 2001. Recuperado de https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:303dd4fa-07a8-4d20-86a8-0baaf0518d22.0005.02/DOC_1&format=PDF.

UE. Unión Europea (2003a). Reglamento (CE) n 2003/1829 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. *Diario Oficial*. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1829&from=ES>.

UE. Unión Europea. (2003b). Reglamento (CE) n 2003/1830 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre del 2003, relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos, y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1830&from=ES>.

USDA. (2018).United State Departament of Agriculture Agricultural .Marketing Service. National Bioengineered Food Disclosure Standard (21 de diciembre del 2018).<https://www.federalregister.gov/documents/2018/12/21/2018-27283/national-bioengineered-food-disclosure-standard> Visitado el 11 de octubre del 2020.

USDA (2019) United State Departament of Agriculture .<https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/BEFactSheet.pdf>. Visitado el 11 de octubre del 2020.

USDA.(2020) United State Departament of Agriculture..What is a bioengineered food?.Recuperado de https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/BE_Consumer.pdf. Desacargado el 9 de octubre del 2020.

USDA /FAS. (2014).United State of Departament of Agriculture. Foreing Agriculture Service Agricultural Biotechnology Report for Panama .Recuperado de https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Panama%20City_Panama_7-15-2014.pdf.

USDA/FAS(2020a).United State of Departament of Agriculture Foreing Agriculture Service."Agricultural Biotechnology Report for Mexico". Recuperado de https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Mexico%20City_Mexico_10-20-2019.

USDA/FAS(2020b). Exporter Guide .Recuperado de https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Exporter%20Guide_Panama%20City_Panama_12-31-2019.

USDA/FAS (2020c).United State of Departament of Agriculture.Foreing Agriculture Service. "Agricultural Biotechnology Report for Panama" .Recuperado de https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Panama%20City_Panama_10-20-2019

Vaca, J. C., Pulido, A. J., & López, K. (2015). Optimization of low pressure biobalistics conditions for analysis of transient expression of heterologous gene in tobacco leaves tobacco cultivated in vitro. *Acta Agronómica*, 64(2), 146-155.

Vaca, J. C., Carrasco, E. C., & López, K. (2019). Evaluation of the biotechnological potential of a promoter derived from passion fruit leaf distortion virus (PLDV), a begomovirus that infects passionfruit. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 91-100.

- Valasek, MA y Repa, JJ (2005). El poder de la PCR en tiempo real. *Avances en la educación fisiológica*, 29(3), 151-159.
- Van den Bulcke, M., Lievens, A., Barbau-Piednoir, E., MbongoloMbella, G., Roosens, N., Sneyers, M., & Casi, A. L. (2010). A theoretical introduction to "Combinatory SYBR® Green qPCR Screening", a matrix-based approach for the detection of materials derived from genetically modified plants. *ANAL BIOANAL CHEM*, 396(6), 2113-2123.
- Van den Eede, G., Bonfini, L., Cengia, L., Iannini, C., Kluga, L., & Mazzara, M. (2010). Compendium of reference methods for GMO analyses (en línea). Publications Office of the European Union. Consultado 30 mar. 2016.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BIOTECHNIQUES* 44(5), 619-626.
- Vázquez, J. M. (2020). Sobre los Organismos Genéticamente Modificados (OGM). Ensayo Artículo Crónica Entrevista, 5.
- Vela Rojas, A. F. (2013). Diseño de un método de detección múltiple para la identificación de organismos genéticamente modificados en alimentos procesados (Master's thesis).
- Velasquez, L. F., Dan'ithza, S. R. T., & Cerón, J. A. (2018). Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 89-100.
- Verdugo, A. A., Castro, L., Gutiérrez, M. A., & Martínez, J. L. (2019). Metodologías para el análisis de expresión y cuantificación de proteínas conferidas en tejidos de cultivos GM. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 815-828.
- Vilchez Carrera, L. (2017). Los alimentos transgénicos: el etiquetado y su falta de reglamentación en el Perú.
- Vinueza, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 10(2), 1-13.
- Vogel B. (2016). *New Plant Breeding Techniques. Update of the 2012 Baseline Report* Swiss Federal Office for the Environment [BAFU/FOEN], Soil and Biotechnology Division. Switzerland.
- Vorburger, S. A., & Hunt, K. K. (2002). Adenoviral gene therapy. *The oncologist*, 7(1), 46-59.
- Wang W, Kutny PM, Byers SL, Longstaff CJ, DaCosta MJ, Pang C, Zhang Y, Taft RA, Buaas FW, Wang H. (2016). Delivery of Cas9 Protein into Mouse Zygotes

- through a Series of Electroporation Dramatically Increases the Efficiency of Model Creation. *J GEN GENOMICS*;43(5):319–327.
- Wang, X., Tang, T., Miao, Q., Xie, S., Chen, X., Tang, J., ... & Xu, J. (2019). Detection of transgenic rice line TT51-1 in processed foods using conventional PCR, real-time PCR, and droplet digital PCR. *FOOD CONTROL*, 98, 380-388.
- Wei, Z. Y., Zhang, Y. Y., Wang, Y. P., Fan, M. X., Zhong, X. F., Xu, N., ... & Xing, S. C. (2016). Production of bioactive recombinant bovine chymosin in tobacco plants. *INT J MOL SCI*, 17(5), 624.
- Wilson, A. K. (2021). Will gene-edited and other GM crops fail sustainable food systems? *Rethinking Food and Agriculture*, 247–284. doi:10.1016/b978-0-12-816410-5.00013-x .
- Wolfram Hemmer. *Food Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods* BATS A, editor.: Center BATS; 1997.
- Wong Vera, Luis y Aguilar Rojas, Olehg. Info RedBio en Panamá. www.redbio.org.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Review Real-time PCR for mRNA quantitation.
- World Health Organization (2016). Frequently asked questions of ogm food. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/005/y2772e/2772e04htm>.
- Wu, H., Qian, C., Wu, C., Wang, Z., Wang, D., Ye, Z., ... & Ji, F. (2020). End-point dual specific detection of nucleic acids using CRISPR/Cas12a based portable biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 157, 112153.
- Wu, G., Wu, Y., Nie, S., Zhang, L., Xiao, L., Cao, Y., & Lu, C. (2010). Real-time PCR method for detection of the transgenic rice event TT51-1. *Food chemistry*, 119(1), 417-422.
- Xu, J., Qin, Z., Bai, J., Bai, L., Liu, Y., Wang, Q., & Wang, M. (2020). Detection of stacked-traits event in mixed transgenic soybean sample. *Journal of Food Safety and Quality*, 11(15), 5287-5293.
- Yang, H., Peng, C., Xiao, Y., Wang, X., & Xu, J. (2018). Study of conventional PCR and qRT-PCR detection methods for genetically modified soybean (*Glycine max*) SHZD32-1. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 26(3), 492-501.
- Yarmush ML, Golberg A, Sersa G, Kotnik T, Miklavcic D (2014). Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. *ANNU REV BIOMED ENG*;16(1):295–320.
- Zamora, P., Pascual, A., & Puigredon, A. (2011). Organismos modificados genéticamente: del mundo a Cataluña.

Zeng, P, Vадnais DA, Zhang Z, Polacco J (2004) Refined glufosinate selection in Agrobacterium-mediated transformation of soybean [Glycine max (L.) Merrill]. PLANT CELL REP, 22:478482.

Zhang, Z., Xing, A., Staswick, P., & Clemente, T. E. (1999). The use of glufosinate as a selective agent in Agrobacterium-mediated transformation of soybean PLANT CELL TISS ORG., 56(1), 37-46.

Zhang, C., Wohlhueter, R., & Zhang, H. (2016). Genetically modified foods: A critical review of their promise and problems. *Food Science and Human Wellness*, 5(3), 116-123.

Zimmermann, A; Lüthy, J; Pauli, U. (1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A* 207(2):81-9.

Zylberberg, C. y Matosevic, S. (2016). Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *DRUG DELIV*, 23(9), pp. 3319-3329. <http://doi.org/10.1080/10717544.2016.1177136>

Anexo 1.

Lista de productos analizados

Descripción	País de origen
Aceite de soya	Argentina
Aceite de soya	Argentina
Aceite de soya	U.S.A
Aceite de soya	Panamá- Boston
Aceite de soya	Argentina
Aceite de soya	Brasil
Aceite de maíz	Argentina
Aceite de soya	Argentina
Aceite de soya	Panamá-Boston
Aceite de soya	U.S.A
Bebida que contiene proteína de soya	U.S.A
Leche a base de soya	U.S.A
Bebida a base de soya	U.S.A
Bebida a base de soya	U.S.A
Salsa china a base de soya	U.S.A
Salsa a base de soya	El Salvador
Salsa de soya	Panamá
Concentrado de soya	Panamá
Salsa de soya	U.S.A

Descripción	País de origen
Concentrado de soya	Panamá
Cereal de maíz	México
Cereal de maíz, arroz salvado de trigo	México
Hojuelas de maíz	Mexico
Cereal de arroz y avena	U.S.A
Hojuelas de maíz y trigo	Perú
Hojuelas de maíz	U.S.A
Hojuelas de maíz	Guatemala
Barras de cereal tiene lecitina de soya	U.S.A
Barras de cereal manzana y canela	México
Barras de cereal contiene lecitina de soya	Colombia
Barra de cereales contiene lecitina de soya	México
Barra de cereal contiene lecitina de soya y avena	México
Barra de cereal contiene lecitina de soya	Guatemala
Galleta contiene lecitina de soya	España
Galletas contiene lecitina de soya	U.S.A
Galletas contiene lecitina de soya	Brasil
Snack de maíz contiene lecitina de soya	España
Snack de arroz, maíz tiene certificado de NON GMO	U.S.A
Snack de maíz, arroz. Certificado de NON OGM	U.S.A

Proteína de soya texturizada	Panamá
Proteína de soya en trozos	Panamá
Proteína de soya texturizada 100%	Panamá
Tortillas de maíz	Panamá
Tortillas que contienen aceite de soya.	U.S.A
Contiene lecitina de soya	España
Contiene proteína de soya	México
Contiene proteína de soya	U.S.A
Bebida de soya	Costa Rica
Bebida de soya	Panamá
Harina de maíz	Colombia
Harina de maíz	Guatemala
Salchichas de soya	Costa Rica
Harina de maíz	Colombia

Anexo 2 Muestras compradas utilizadas en el análisis



Anexo 3 Kit de extracción de ADN de ThermoFisher Scientific



Anexo 4 Preparación de muestras para la extracción de ADN



Anexo 5 Proceso de extracción de ADN de las muestras



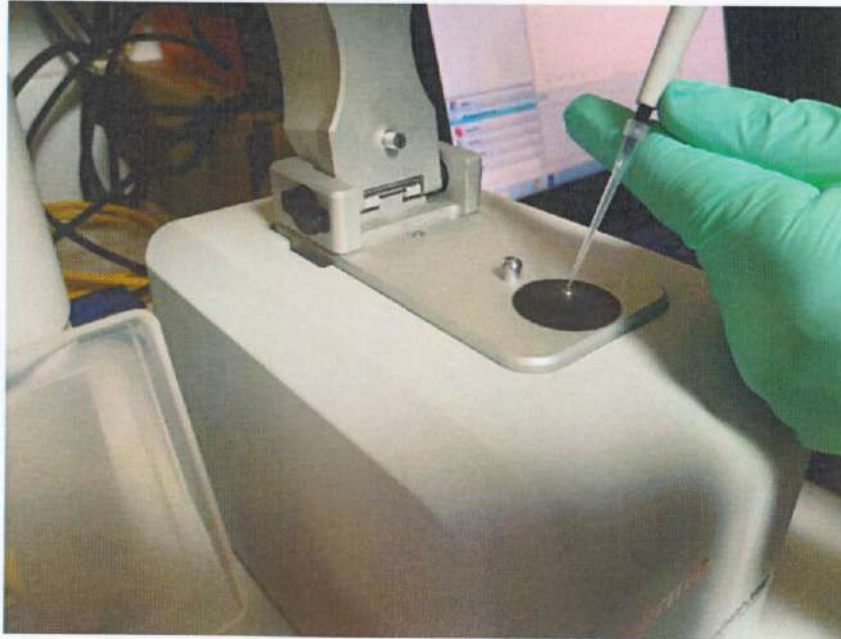
Anexo 6 Muestra con el Buffer de Lisis 1 durante el proceso de extracción



Anexo 7 Muestras de ADN extraídas de los alimentos



Anexo 8 Determinación de la concentración y pureza del ADN con el equipo Nanodrop 2000



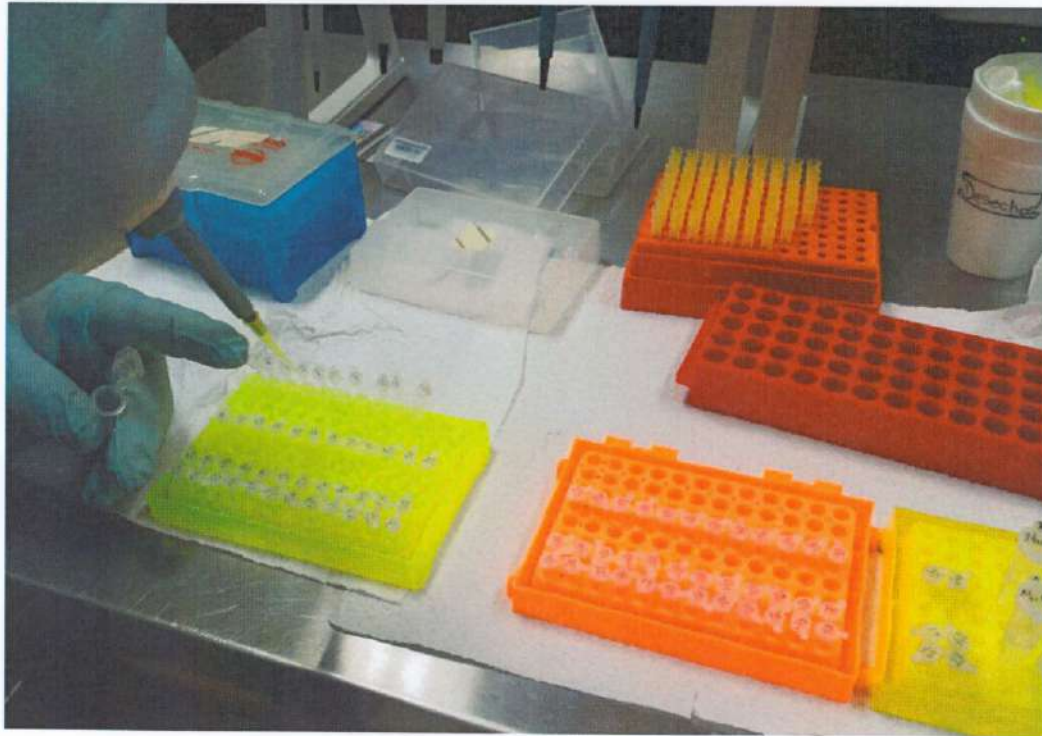
Anexo 9 Preparación de la placa de reacción óptica para la detección por qRT-PCR.



Anexo 10 Equipo empleado para PCR en tiempo real



Anexo 11 Preparación de muestras para PCR convencional



**Anexo 12 Colocación de los microtubos en el termociclador
Para PCR convencional.**



Anexo 13 Colocación de las muestras sobre gel de agarosa



Anexo 14 Electroforesis en gel de agarosa

