

Módulo Didáctico: RECURSOS GENÉTICOS y BIOSEGURIDAD

Lambayeque, 20 – 22 de Marzo de 2012

“BASES TÉCNICAS PARA LA SEGURIDAD DE BIOTECNOLOGÍA”

Eliana Yglesias Gálvez
Dirección General de Diversidad Biológica



TRANSGÉNICOS

1. Definiciones y conceptos básicos
2. Obtención de transgénicos
3. Importancia de los transgénicos
4. Métodos de detección de OVM
5. Etiquetado



1. DEFINICIONES Y CONCEPTOS BÁSICOS

1. Biotecnología moderna
2. OVM
3. Ingeniería Genética
4. Transgén

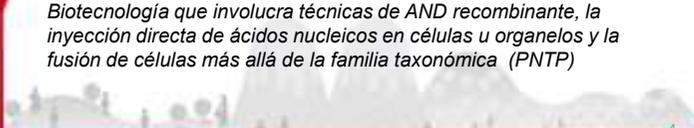


Biotecnología moderna

Aplicación de:

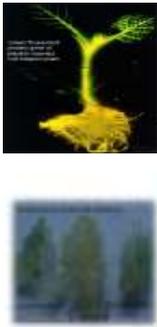
- a) Técnicas in vitro de ácidos nucleicos, incluidos el ácido desoxirribonucleico (AND) recombinante y la inyección directa de ácidos nucleicos en las células u organelos, ó
- b) La fusión de células más allá de la familia taxonomica que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional.
(Protocolo de Cartagena)

Biotecnología que involucra técnicas de AND recombinante, la inyección directa de ácidos nucleicos en células u organelos y la fusión de células más allá de la familia taxonomica (PNTP)



Organismo Vivo Modificado (OVM)

- Cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la biotecnología moderna (Protocolo de Cartagena).
- Se entiende como cualquier entidad biológica capaz de ser transferir o replicar material genético, incluidos los organismos estériles, los virus y los viroides (PNTP).



5

Ingeniería Genética

- Conjunto de metodologías y técnicas dirigidas a lograr la modificación del material hereditario de una especie, con el fin de conferirle atributos (por ejemplo características del individuo o capacidad de producir sustancias) que no los tenía hasta ese momento.



6

Transgén

Es el gen construido mediante ingeniería genética que se transfiere a una especie.

Ejemplo:

- El gen *cp4 epsp* tomado de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (cepa CP4).

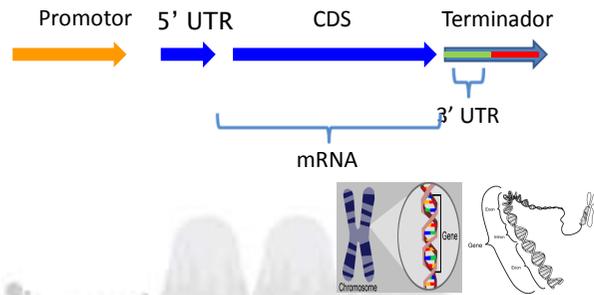
Su origen puede ser :

- Vegetal
- Animal
- Microbiano
- Sintético

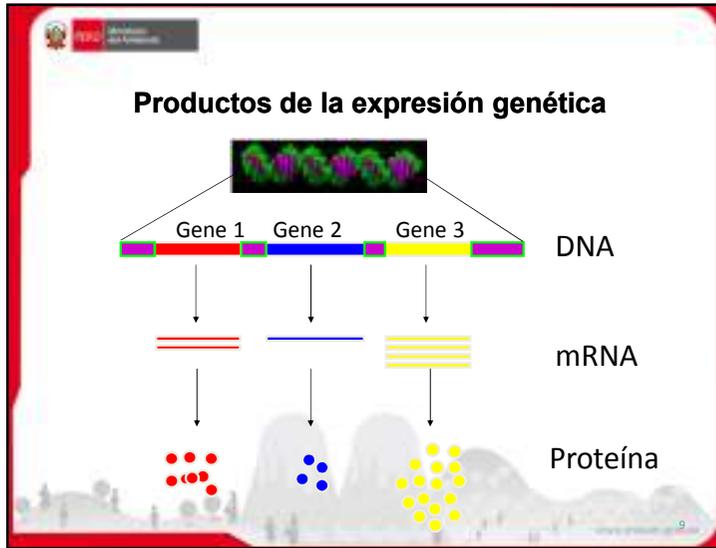


7

Estructura de un gen



8



¿Qué son los Transgénicos?

- Organismos manipulados genéticamente que incorporan genes de otras especies, dándoles características diferenciales respecto al organismo original.
- Sus descendientes heredan este mismo gen del mismo modo que los propios.

10

Comparación entre transgénesis y mejoramiento convencional

La Biotecnología Moderna introduce el gen de otra especie en una planta y la transforma

El mejoramiento tradicional se basa en cruzamientos y selección entre la descendencia

11

Comparación entre transgénesis y mejoramiento convencional

El mejoramiento tradicional

La Biotecnología Moderna

12

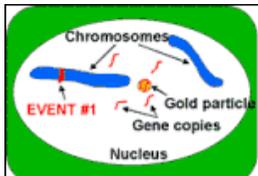
Versión y combinación de genes

- Pueden existir diferentes versiones de un gen
 Por ejemplo, para los genes *Bt* se tiene *Cry1a(b)*, *Cry1a(c)*, *Cry9c*, etc.
- Por lo que se puede registrar diferentes variedades.
- La combinación de la versión exacta del gen y su ubicación eventual dentro del genoma se denomina "evento"

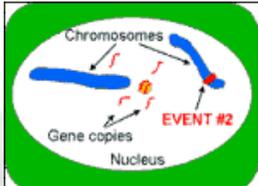
Por ejemplo, dos compañías usan el mismo gen *Bt* pero localizados en diferentes posiciones dentro del ADN, por tanto, se trata de dos "eventos" diferentes

Versión y combinación de genes

Evento 1



Evento 2



2. OBTENCIÓN DE TRANSGÉNICOS

Etapas en la obtención de un transgén:

- Identificación del problema.
- Identificación del gen de interés para el hospedero adecuado.
- Construcción del transgén.
- Transformación genética.
- Selección y ensayos en espacio confinado.
- Ensayos en campo y liberación.

Etapas en la obtención de un transgén

Identificación del problema que se desea resolver:

- Identificación y valoración de los problemas que no pueden ser fácilmente resueltos con métodos convencionales.
- Identificación del tipo de problema que se quiere solucionar: resistencia a plagas, sequía, patógenos, valor nutricional, otros.



Etapas en la obtención de un transgén

Identificación del gen de interés

Mediante estudios de prospección.
Mejoramiento convencional.
Marcadores moleculares.
Bioinformática.

Genes utilizados y carácter conferido en plantas transgénicas

Tipo de gen utilizado en transgénesis	Caracter que confiere a la planta
Toxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistencia a Insectos
Proteína de la cubierta viral	Resistencia a Virus
Quitinasas, glucanasas de plantas y de otros organismos	Resistencia a Hongos
Lisozima humana y de cerdo. Otros péptidos bactericidas	Resistencia a Bacterias
Genes cuyos productos afectan la biosíntesis de aminoácidos, o la fotosíntesis	Resistencia a Herbicidas
Genes cuyos productos afectan la biosíntesis del etileno, o la formación de pared celular	Retraso maduración de frutos

Etapas en la obtención de un transgén

Construcción del transgén ("constructo")

Gen marcador de selección: resistencia a antibióticos (Kan)
Promotor (35S CaMV)
Gen de interés
Gen de terminación (Nos)

Etapas en la obtención de un transgén

Construcción del transgén ("constructo")

35S CaMV

Promotor:

- Inicia la transcripción.
- Controla la expresión del gen.
- Los mas comúnmente usados son los derivados del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), 19S CaMV y 35S CaMV.

Etapas en la obtención de un transgén

Construcción del transgén ("constructo")

Genes de interés:

- Tolerancia al herbicida Glyphosato *Zea mays* L. (maíz Roundup Ready®)
- Tolerancia al herbicida Fosfinitricina PPT – Glifocinato de amonio
- Resistencia a *Ostrinia nubilalis* (Perforador europeo de la mazorca)



21

Etapas en la obtención de un transgén

Construcción del transgén ("constructo")

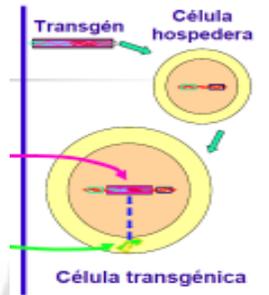
En plantas existen tres clases de genes marcadores seleccionable:

- Genes que dan resistencia a los antibióticos. 
- Genes que dan resistencia a herbicidas 
- Genes involucrados con varias vías metabólicas.

22

Etapas en la obtención de un transgén

Transformación genética:



23

Etapas en la obtención de un transgén

Transformación genética:

- Mediada por *Agrobacterium*.
- Por biolística (Gene Gun).
- Por electroporación.



24

Etapas en la obtención de un transgén
Transformación genética mediada por *Agrobacterium*



Transformación genética mediada por *Agrobacterium*

- *Agrobacterium* es una bacteria que causa una enfermedad conocida como "agalla de la corona" en plantas.
- Es un parásito y puede causar grave daño a la planta afectada.
- Se encuentra en el suelo.



Transformación genética mediada por *Agrobacterium*

- Infecta en la corona de la raíz o apenas por debajo del nivel del suelo.
- Puede sobrevivir en el suelo independientemente de la planta huésped.
- Infecta a la planta a través de cortes o heridas.
- Es un patógeno común en plantas herbáceas, arbustos leñosos y dicotiledóneas.
- Las agallas producidas son estructuras globulares similares a tumores.



Transformación genética mediada por *Agrobacterium*

- La relación *Agrobacterium* – planta es un caso único de transferencia de ADN entre bacterias y plantas (reinos diferentes).
- Esta situación es aprovechada para emplear a la bacteria como un vector natural para la transformación en plantas.

Transformación genética mediada por *Agrobacterium*

- *Agrobacterium* se usa para producir plantas transgénicas debido a que el T-ADN es definido por sus bordes, más no por las secuencias que contiene.
- Por ello, los investigadores pueden sustituir la región codificante T-ADN por cualquier secuencia de ADN sin que haya un efecto a partir en su transferencia del *Agrobacterium* a la planta.

Transformación genética mediada por *Agrobacterium*

The diagram illustrates the process in two parts: (A) Gall caused by *A. tumefaciens* and (B) Using the T₁ plasmid.

1. Isolate the bacteria from a plant gall.
2. Isolate the T₁ plasmid from the bacterium cytoplasm.
3. Cut the plasmid with a restriction enzyme.
4. Use the same enzyme to cut the gene of interest.
5. Attach the gene to attach to the plasmid.
6. Expose plasmids to young plant cells in culture.
7. Reize plant cells to maturity.

Genetically modified plant contains new gene and runs characteristic.

Etapas en la obtención de un transgén

Transformación genética mediada por biolística (*Biolistic Particle Delivery System*)

Transformación genética mediada por biolística (*Biolistic Particle Delivery System*)

- Método físico de transformación de células mediante el cual se bombardea con partículas de oro o tungsteno recubiertas de ADN, de alta densidad, de tamaño subcelular que son aceleradas mediante flujo de helio presurizado a gran velocidad para introducir ADN dentro de células vivas.
- Fue inicialmente propuesto para su uso con plantas ahora tiene mayores aplicaciones.

Transformación genética mediada por biolística (*Biolistic Particle Delivery System*)

gene gun barrel

plastic disc with DNA-coated gold particles

disc stopped by screen

DNA-coated gold particles

target plant cells

newly inserted gene

plant chromosome

Transformed plant cell

Source: Marmura

Transformación genética por biolística

Agrobacterium method

Particle gun method

Agrobacterium tumefaciens

Ti plasmid carrying desired genes

Particles coated with DNA encoding desired genes

Particle gun

Coincubation of Agrobacterium with plant pieces

Bombardment of plant pieces with particles

DNA transferred to plant cells

Chromosomes with integrated DNA encoding desired genes

Plant cell

Nucleus

Cell multiplication (callus)

Shoot regeneration followed by root regeneration

Plant with new trait

Etapas en la obtención de un transgén

Transformación genética por electroporación

Electroporador: equipo que crea un campo magnético que altera la permeabilidad de las membranas celulares.

Transformación genética por electroporación

- La electroporación es un proceso mediante el cual se aplica un campo eléctrico (pulsos) a una célula viva por un pequeño período de tiempo, ocasionando una ruptura transitoria reversible de la membrana celular.
- Esta ruptura transitoria resulta en la formación de poros que permiten que moléculas exógenas (ADN, proteínas o drogas) ingresen a la célula.

Transformación genética por electroporación

Introduzca moléculas a la célula.

Apply the pulse; pores form in the cells and the molecules enter.

After the pulse, the pores reseal and the molecules remain in the cell.

3. IMPORTANCIA DE LOS TRANSGÉNICOS

- Las generaciones de transgénicos.
- Cultivos transgénicos.
- Peces transgénicos
- Otros transgénicos disponibles hoy.

Las Generaciones de Transgénicos

1ra Generación: Características introducidas como insumos agrícolas y combate de plagas.
- plantas *Bt* y plantas RR.

2da Generación: Tecnologías que incluyen productos de calidad mejorada para la nutrición y procesos industriales "ALIMENTOS FUNCIONALES".

3ra Generación: Cultivos o animales utilizados como "biofábricas" para la producción de fármacos (vacunas, enzimas industriales).

Transgénicos de 1ra Generación

Resistencia a las plagas:
... la resistencia a los insectos (Maíz *Bt*.)
resistencia al taladro. Incorpora el gen de la endotoxina *Bt* ("*Bacillus thuringiensis*").

Aplicaciones:
Alimento para animales.
Grasas comestibles: Margarina, aceites.
Edulcorantes: Bebidas de frutas, cereales y helados.
Maíz molido: Harina, copos de maíz.

Plantas transgénicas Bt

Sociedad Bt transgénica

Bt Gene is inserted into crop.

Crop is infected by European corn borer.

Pest dies when feeding on any plant part.

41

Plantas / Líneas transgénicas Bt

Planta / Línea transgénica	Compañía	Descripción
Algodón: MON810/PI910109	Monsanto	- Algodón resistente a insectos plagas, expresa el gen cryIIAb de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-73.
Maíz Dent 175	Syngenta Seeds	- Maíz resistente a insectos (paga, oruga) el gen cryIIAb de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> . Esta modificación le brinda protección frente al ataque del barrenador europeo del maíz (<i>Pyrausta nubilalis</i>).
Maíz BT11 (NUS10139A, 3473429A)	Syngenta Seeds	- Maíz resistente a insectos (paga y tolerante a herbicidas), expresa el gen cryIIAb de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> y el gen de la fosfofructo N-acetiltransferasa de <i>S. zeamomora</i> .
Maíz DDT418	Dekalb Genetics	- Maíz resistente a insectos (paga) y tolerante a herbicidas, expresa el gen cryIIAc de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> y el gen de la fosfofructo N-acetiltransferasa de <i>S. zeamomora</i> .
Maíz MON818	Monsanto	- Maíz resistente a insectos (paga), expresa un gen cryIIAb derivado de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-1. Esta modificación le brinda protección frente al ataque del barrenador europeo del maíz (<i>Pyrausta nubilalis</i>).
Maíz MON-DNK05-6 x MON-DNK05-8	Monsanto	- Maíz resistente a insectos (paga) y tolerante a herbicidas, derivado del cruce de las líneas parentales NK602 y MON818.
Maíz TC1507	Mycogen	- Maíz resistente a insectos (paga) y tolerante a herbicidas, expresa el gen cryIIA de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> y el gen de la fosfofructo N-acetiltransferasa de <i>S. zeamomora</i> .

Sauka & Benintende, 2008

42

Transgénicos de 1ra Generación

Tolerancia a Herbicidas:

La soja "Roundup Ready" contiene un gen bacteriano que codifica la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa, que participa en la síntesis de los a.a. aromáticos. El vegetal que no contiene dicho gen, es inhibido por el glifosato, de ahí su acción herbicida.

Aplicaciones:
harina, concentrados proteicos, lecitinas, aceite,...

43

Transgénicos de 1ra Generación

Plantas sensibles a RR

Shikimate acid + Phosphoenol pyruvate

+ Glyphosate

~~Enzyme~~ EPSP synthase

3-Enolpyruvyl shikimate acid-5-phosphate (EPSP)

Without amino acids, plants die

Aromatic amino acids

Plantas sensibles a RR

Shikimate acid + Phosphoenol pyruvate

+ Glyphosate

Bacterial Enzyme EPSP synthase

3-Enolpyruvyl shikimate acid-5-phosphate (EPSP)

With amino acids, plant lives

Roundup has no effect, enzyme is resistant to herbicide

Aromatic amino acids

44

Transgénicos de 2da Generación

Golden Rice



Arroz convencional



Arroz transgénico enriquecido con pro-vitamina A

Transgénicos de 3ra Generación

En animales domésticos:

- Producción de grandes cantidades de vacunas para animales domésticos que pueden ser más seguras que las vacunas tradicionales.
- Pruebas para diagnóstico de enfermedades y defectos genéticos.
- Producción de somatotropina recombinante produce animales con menor cantidad de grasa y aumento de la producción de leche.

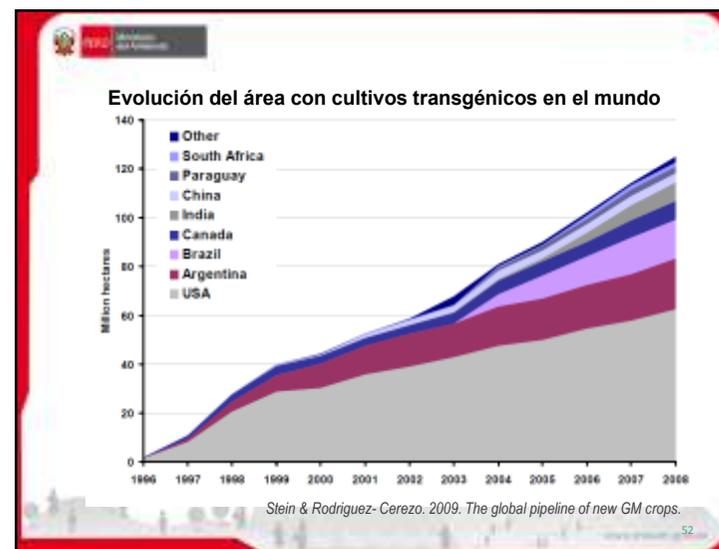
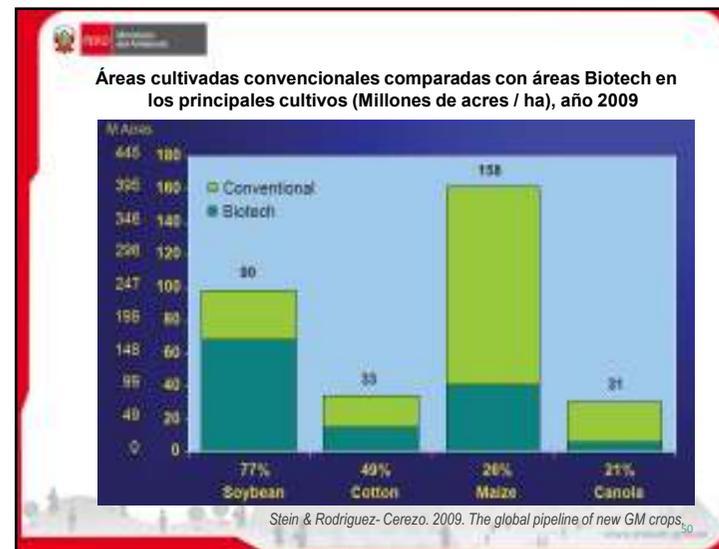


Otros transgénicos de segunda y tercera

OVGM	Modificación	Fuente del gen	Propósito de la Modificación
<i>Escherichia coli</i> K12	Producción de Renina	Vacas	Producción de Queso
Salmon	Hormona del crecimiento	Salmón	Aumentar el crecimiento
<i>Eucaliptus</i>	Modificación de la lignina	<i>Pinus</i> sp.	Procesamiento de pulpa
Arroz	caroteno	Daffodil <i>Erwina</i>	Suplir déficit de Vitamina A
Oveja	Expresión de Anticuerpos en la leche	<i>H. Sapiens</i>	Leche Fortificada.

Cultivos Transgénicos

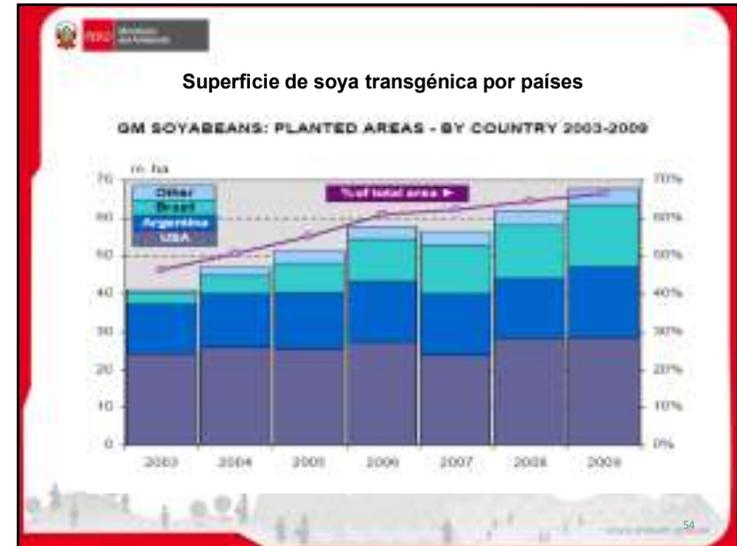




Superficie de soja transgénica cultivada por países 2003-2009

País	2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009	
	M.has	% total												
EEUU	24,1	81,0	25,9	85,0	25,4	87,0	27,2	89,0	23,8	91,0	28,2	92,0	28,5	91,0
Argentina	13,2	94,5	14,1	97,6	15,0	98,7	16,1	99,0	16,2	99,0	15,8	99,0	18,6	99,0
Brasil	3,0	16,3	5,0	23,2	7,8	35,0	11,0	53,1	12,8	60,0	14,1	65,0	16,2	70,1
Paraguay			1,2	60,0	2,1	85,0	2,0	85,0	2,5	93,0	2,4	95,0	2,7	95,0
Uruguay	T	24,2	0,3	100,0	0,3	100,0	0,4	100,0	0,4	100,0	0,6	100,0	0,8	100,0
Canadá	0,5	45,0	0,6	45,0	0,5	45,0	0,5	45,0	0,6	48,0	0,6	50,3	0,6	43,4
Sudáfrica	T	31,1	T	70,0	0,1	50,0	0,1	74,9	0,1	79,8	0,2	79,9	0,3	85,0
Méjico	T	14,7	T	14,2	T	16,1	T	9,3	T	11,9	T	15,0	T	21,4
UE (Rumania)	0,1	63,6	T	73,7	0,1	70,2	0,1	82,1	-	-	-	-	-	-
Total soja transgénico	40,9		47,1		51,3		57,5		56,4		61,9		67,7	
Total soja	88,4		93,2		92,9		94,2		90,7		96,3		101,8	
% transgénico	46,3		50,6		55,2		61,1		62,2		64,3		66,5	

Fuente: USDA, ISAAA y CIC estimaciones
T: menos de 100.000 has; (€) Estimaciones

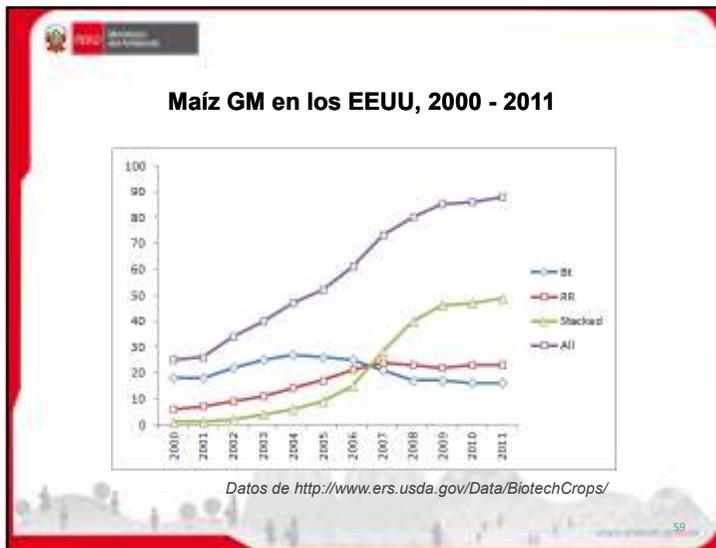
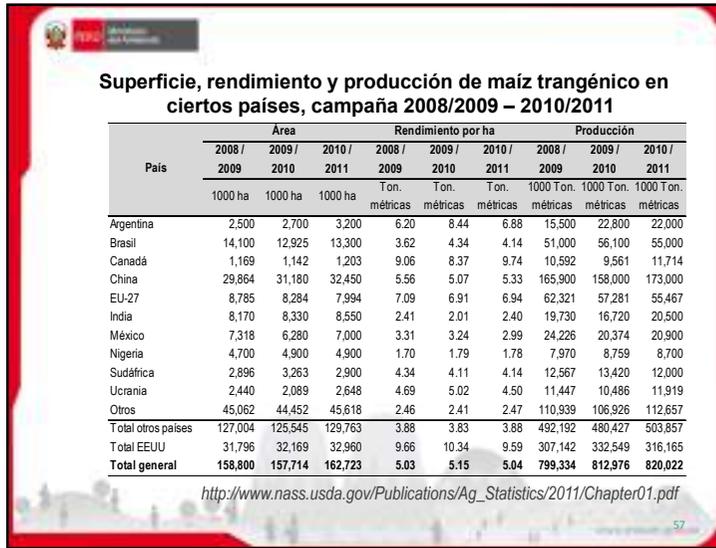


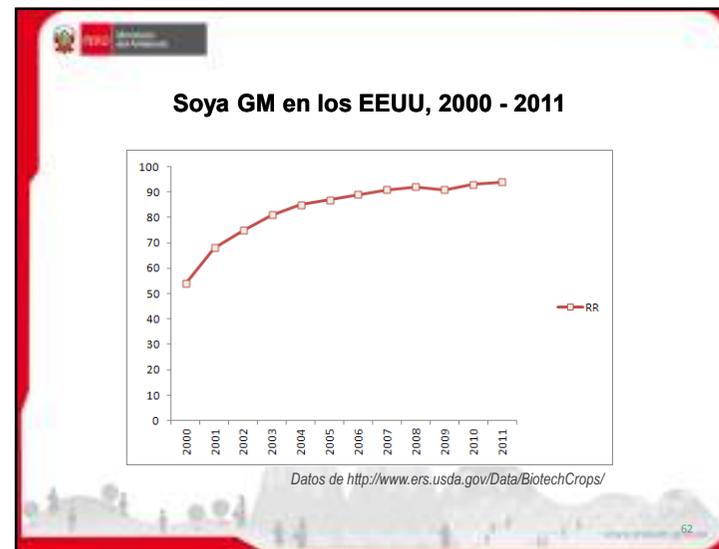
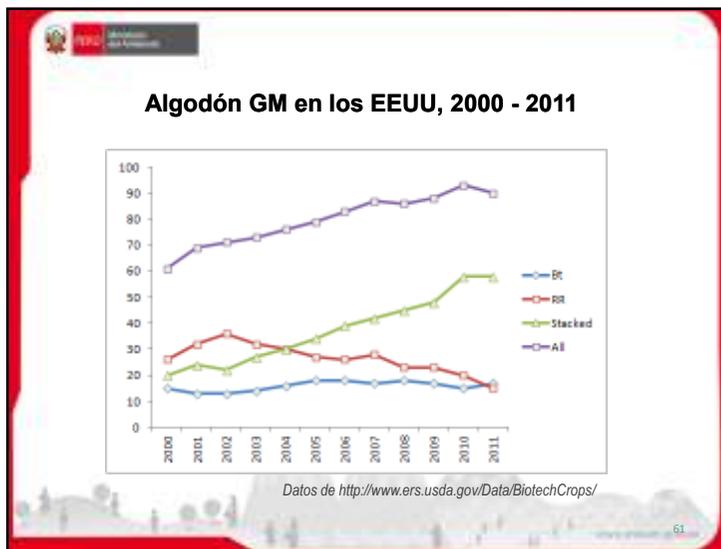
Superficie de maíz transgénico cultivado por países 2003-2009

País	2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009	
	M.has	% total												
EEUU	12,7	40,0	15,4	47,0	17,2	52,0	19,3	61,0	27,6	73,0	27,8	80,0	29,7	85,0
Argentina	1,2	50,0	2	59,4	2,2	68,0	2,1	73,0	3,1	74,0	2	75,0	2,6	81,3
Brasil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	9,2	4,1	30,0
Sudáfrica	12,5	12,5	0,4	14,5	0,5	28,5	1,2	46,2	1,6	55,6	1,5	62,2	1,8	65,6
Canadá	35,0	35,0	0,4	37,0	0,4	39,7	0,5	44,4	0,6	46,6	0,6	53,8	0,7	61,7
Uruguay	3,0	3,0	T	38,0	T	56,0	T	60,3	T	56,2	0,1	55,6	0,1	56,0
España	6,7	6,7	T	12,5	T	14,8	T	18,1	0,1	21,4	0,1	21,8	0,1	22,0
Total maíz transgénico	14,6		18,4		20,4		23,3		33,4		33,8		39,6	
Total maíz	142,4		145,0		142,9		147,0		158,0		153,8		152,3	
% transgénico	10,3		12,7		14,3		15,9		21,1		22,0		26,0	

Fuente: USDA, ISAAA y CIC estimaciones
T: menos de 100.000 has; (€) Estimaciones







Eventos aprobados para consumo en Colombia

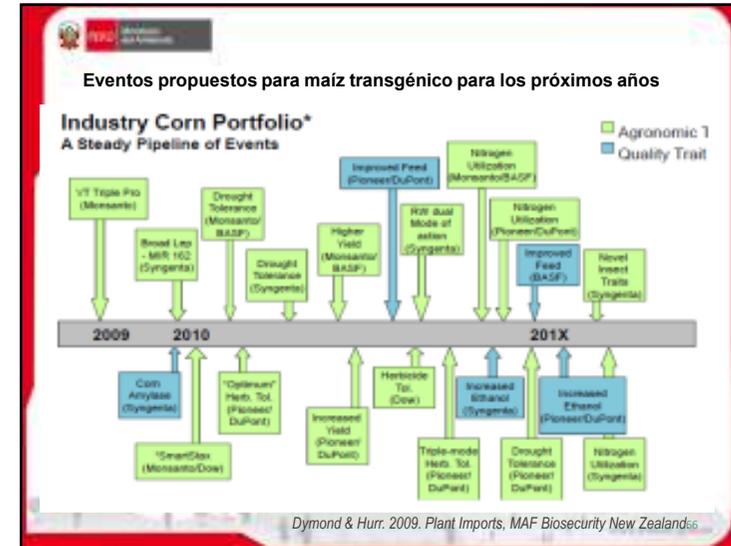
Nombre Común	Tecnología	Identificador único	Uso
Algodón	Bollgard	MON-00531-6	Consumo humano
Algodón	Roundup Ready	MON-01445-2	Consumo humano
Maíz	Yieldgard	MON-00810-6	Consumo humano
Maíz	Roundup Ready	MON-00603-6	Consumo humano
Trigo	Roundup Ready	MON-71800-3	Consumo humano
Semilla de soya	Roundup Ready	MON-04032-6	Consumo humano
Remolacha azucarera	Roundup Ready	KM-00071-4	Consumo humano
Maíz	Bt Herculex I Bt Cry1F 1507	DAS-01507-1	Consumo humano
Algodón	Bollgard X Round Ready	MON-ΦΦ531-6 x MON-Φ1445-2	Consumo humano
Maíz	Bt11	SYN-BT-011-1	Consumo humano
Arroz	Liberty	LLRICE 601	Consumo humano
Arroz	Liberty	LLRICE 62	Consumo humano

Eventos aprobados en Argentina para siembra consumo y comercialización

Cultivo	Característica introducida	Evento	Insectos	Herbicidas	Año de aprobación
Maíz	Resistencia a insectos lepidópteros	176	lepidópteros, <i>Ostrinia nubilalis</i>		1998
Maíz	Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	T25		glufosinato de amonio	1998
Maíz	Resistencia a insectos lepidópteros	MON810	lepidópteros		1998
Maíz	Resistencia a insectos lepidópteros	Bt11	lepidópteros		2001
Maíz	Tolerancia al herbicida glifosato	NK603		glifosato	2004
Maíz	Resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	TC1507	Lepidópteros	glufosinato de amonio	2005
Maíz	Tolerancia al herbicida glifosato	GA21		glifosato	2005
Maíz	Tolerancia al herbicida glifosato y resistencia a insectos lepidópteros	NK603 X MON810	lepidópteros	glifosato	2007
Maíz	Tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, y resistencia a insectos lepidópteros	1507 X NK603	lepidópteros	glifosato y glufosinato de amonio	2008
Maíz	Tolerancia al herbicida glifosato y resistencia a insectos lepidópteros	Bt11 X GA21	lepidópteros	glifosato	2009
Maíz	Resistencia a insectos lepidópteros	MON89034	lepidópteros		2010

Eventos aprobados en Argentina para siembra consumo y comercialización (Cont.)

Cultivo	Característica introducida	Evento	Insectos	Herbicidas	Año de aprobación
Maíz	Resistencia a insectos coleópteros y tolerancia al herbicida glifosato	MON88017	coleópteros	glifosato	2010
Maíz	Resistencia a insectos lepidópteros y coleópteros, y tolerancia al herbicida glifosato	MON89034 X MON88017	LI	glifosato	2010
Maíz	Resistencia a insectos lepidópteros	MIR162	lepidópteros		2011
Maíz	Resistencia a lepidópteros y tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio	Bt11xGA21x MIR162	lepidópteros	glifosato y glufosinato de amonio	2011
Maíz	Tolerancia al glifosato y a herbicidas inhibidores de la ALS	DP-098140-6		Glifosato y inhibidores de la ALS	2011
Soja	Tolerancia al herbicida glifosato	40-3-2		glifosato	1996
Soja	Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	A2704-12		glufosinato de amonio	2011
Soja	Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	A5447-127		glufosinato de amonio	2011
Algodón	Resistencia a insectos lepidópteros	MON531	lepidópteros		1998
Algodón	Tolerancia al herbicida glifosato	MON 1445		glifosato	2001
Algodón	Tolerancia al herbicida glifosato y resistencia a insectos lepidópteros	MON 1445 X MON531	lepidópteros	glifosato	2009

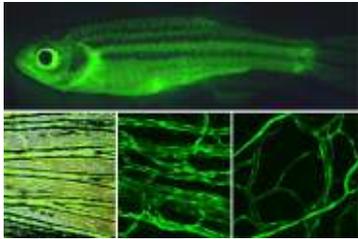


Plantas que han sido transformadas Genéticamente

Abeto	Eucalipto	Pino
Acelga	Frambuesa	Plátano
Alfalfa	Frutilla	Poroto
Algodón	Kiwi	Poroto de soja
Alamo	Lechuga	Remolacha
Arabidopsis	Lirio	Repollo
Arroz	Maíz	Rosa
Arveja	Maní	Sorgo
Camote	Manzana	Tabaco
Caña de azúcar	Maravilla	Tomate
Cebada	Orquidea	Tulipán
Centeno	Papa	Trigo
Clavel	Papaya	Vides
Crisantemo	Petunia	Zanahoria
Espárrago	Pera	Zapallo



Peces transgénicos



69

Definiciones y conceptos básicos

- Los peces constituyen una importante fuente de proteína, especialmente para cubrir la demanda de alimento
- La acuicultura (peces, moluscos, crustáceos y algas) ha respondido aumentando su infraestructura, con selección y mejoramiento clásico para algunas pocas especies e intensificando su producción: de un suministro per cápita de 0,7 kg en 1970 a 7,8 kg en 2006 (FAO, 2008)
- Hay mucho interés en el potencial de los peces transgénicos para aumentar la capacidad productiva
- Actualmente China es el mayor productor en el mundo

70

Definiciones y conceptos básicos

Algunas características de interés para el desarrollo de peces transgénicos (Hayes, 2007):

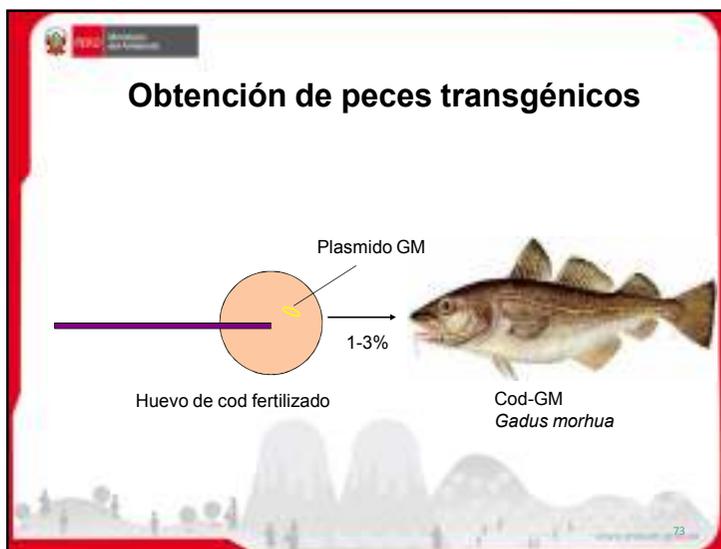
- Reducción del tiempo de desarrollo (ciclo de producción).
- Mejorar la eficiencia en la conversión de alimento.
- Mejorar la gama de condiciones ambientales toleradas para un buen crecimiento y desarrollo.
- Uso de los peces como bio-factorías.
- Esterilización para prevenir el flujo génico a parientes silvestres.
- Sincronización de la reproducción.

71

Obtención de peces transgénicos

1. Selección del ADN foráneo a introducir conteniendo las características de interés
2. Introducción del DNA en los embriones de los peces
3. Integración del DNA en el genoma del huésped
4. Transmisión a la descendencia

72



Especies en las que está desarrollando la Ingeniería Genética

Nombre Común	Nombre científico	Atributo deseado
Pez cebra	<i>Danio rerio</i>	D6-desaturasa, fitasa
Pez dorado	<i>Carassius auratus</i>	Tolerancia al frío
Tilapia del Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	Crecimiento
Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	Lactoferinas
Pez gato del canal	<i>Ictalurus punctatus</i>	Resistencia a enfermedades
Salmón atlántico	<i>Salmo salar</i>	Crecimiento y tolerancia al frío
Trucha arco iris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Crecimiento, metabolismo de carbohidratos

Riesgos ambientales de los peces transgénicos

- Mayor competitividad por recursos y alimentos que las especies silvestres.
- Daño a poblaciones silvestres afectando sus patrones demográficos.
- Afectar la habilidad de especies silvestres de aparearse y reproducirse.
- Podrían comportarse como especies invasivas al tener un mayor rango de tolerancia ambiental.

Caso del salmón atlántico GM

- La Administración de Alimentos y Drogas de los EEUU (FDA) está considerando la aprobación de salmón atlántico genéticamente modificado para consumo humano.
- El salmón atlántico GM (*Salmo salar*) contiene un gen de crecimiento del salmón del pacífico (*Oncorhynchus tshawytscha*) y un segundo gen de otra especie (*Zoarcetes americanus*).
- Un estudio reciente (Smith *et al.*, de diciembre de 2010) indicaría que la evaluación de riesgos e impactos ambientales de la FDA para la aprobación de este organismo GM estaría incompleto.

Caso del pez cebra en Perú (peces ornamentales)

- El laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad Nacional Federico Villarreal viene realizando ensayos experimentales con especies de peces ornamentales *Danio rerio* (pez cebra).
- Encontrando peces con una coloración distinta a las líneas que trabajaban (blanca gris).
- Con pruebas realizadas se detectó que eran peces cebra fluorescentes tipo K2.
- Se lograron reproducir en condiciones controladas.

4. DETECCIÓN DE OVM

Se requiere contar con metodologías que permitan realizar la detección e identificación de eventos transgénicos de manera sensible, reproducible, rápida y de bajo costo.

Necesario para:

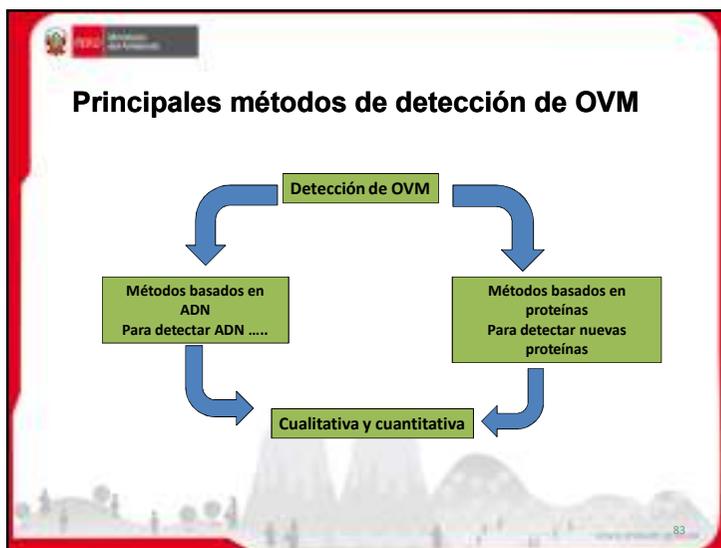


- Asegurar la pureza y segregación de los productos o eventos.
- Poder hacer la trazabilidad de la modificación genética en los cultivos.

Necesario para:

Permitir la trazabilidad de las modificaciones genéticas:

- En la Industria de alimentos y de las compañías de semillas.
- Para asegurar la pureza y segregación de productos.
- Por las autoridades competentes para asegurar el cumplimiento con la legislación.
- Capacidad de identificar productos específicos en el mercado.



Principales métodos de detección de OVM

<p>Métodos basados en el análisis de proteínas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Para materias primas • Se pueden aplicar en el campo • No requiere personal muy especializado • El formato de tiras reactivas no requiere equipo especializado • Metodología simple 	<p>Métodos basados en el análisis de ADN:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Detección en muestras con alto grado de procesamiento • Requieren equipo y personal especializado laboratorio • Los resultados son más precisos • Metodologías más laboriosas
---	--



Principales métodos de detección de OVM

1. Detección inmunológica de las proteínas modificadas:
 - ELISA (Ensayo de inmunodetección)
 - Strips o tiras reactivas
 - Western Blot
2. Detección del ADN de los OVM
 - PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)




85




Requerimientos para la detección de OVM

Moléculas Blanco:

- ADN o proteína.

Captura de moléculas:

- Para ADN: Iniciadores.
- Para Proteínas: Anticuerpos.

Materiales de referencia:

- Controles positivos y negativos.
- Calibradores para cuantificación.

86




Detección inmunológica de las proteínas modificadas

- Esta metodología se basa en el reconocimiento específico de una porción de proteína expresada por el OVM mediante un anticuerpo, recreando una respuesta inmune.
- Puede permitir la detección específica de determinado anticuerpo por un epítipo único.
- Alta especificidad.

87




Detección inmunológica de las proteínas modificadas

ELISA "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"

- Básicamente, esta prueba es una reacción antígeno-anticuerpo que se lleva a cabo en una fase sólida (placa de 96 pozos).
- El antígeno-anticuerpo reacciona y produce un complejo estable que puede ser visualizado por la adición de un segundo anticuerpo unido a una enzima.
- La adición de un sustrato que reacciona con la enzima resulta en una formación de color, que puede ser medida fotométricamente.

88

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

The diagram illustrates the ELISA process in four steps: 1. Sample addition to wells, 2. Addition of enzyme-conjugated antibodies, 3. Addition of substrate, and 4. Color development. To the right is a 12x8 grid of wells labeled A-H and 1-12, showing various color patterns representing different results.

ELISA:
Respuesta

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Lateral flow stick

The diagram shows a person using a lateral flow stick to test a plant sample. The stick is inserted into a small container, and the result is shown on a separate strip.

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Tiras de flujo lateral

- Variación comercial de las pruebas de ELISA que permiten obtener resultados semi cuantitativos de forma sencilla y rápida.
- Se emplean para la detección de OVM en hojas, semillas y granos. Como soporte se emplean tiras de papel o plásticas, que es donde ocurre la reacción.

The diagram shows two lateral flow strips. The left strip is labeled 'Resultado negativo' and has a red line at the 'Línea control' and no line at the 'Línea de prueba'. The right strip is labeled 'Resultado positivo' and has red lines at both the 'Línea control' and the 'Línea de prueba'.

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Tiras de flujo lateral

The diagram illustrates the mechanism of a lateral flow strip. It shows a sample being applied to a support, which then flows through a conjugation support containing antibodies. The flow continues through a membrane with a capture band and a control band, and finally to a manipulation support. The result is shown as a positive control and a valid control.

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Western Blot

- Es un método altamente específico que permite determinar si la muestra contiene la proteína objetivo, eficiente con proteínas insolubles.
- Se basa en la separación de proteínas de una muestra en función de su tamaño mediante electroforesis y posterior detección mediante anticuerpos específicos para la proteína.

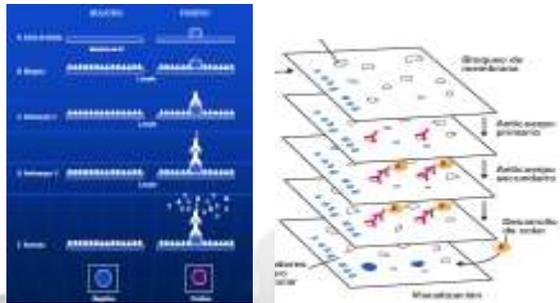


93

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Western Blot

Proteínas transferidas



94

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Ventajas

- No requiere mucha preparación de la muestra.
- Ensayo relativamente rápido (2-4 horas, incluyendo preparación de la muestra).
- Produce resultados cualitativos o semi-cuantitativos.
- Costo relativamente bajo o medio.
- Aplicable para el análisis de muestras numerosas.



95

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Desventajas

- Faltan anticuerpos relevantes para los diversos eventos OVM.
- Pueden producirse falsos positivos.
- No todos los OVM expresan la proteína en todas partes de las plantas.
- ELISA no son evento específico.



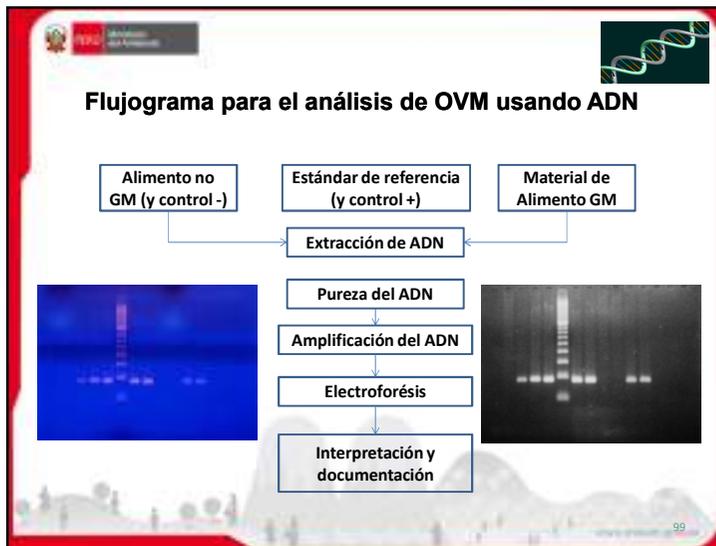
96

Algunos kits de diagnóstico basado en ELISA (Cont.)

Compañía	Nombre del Kit	Formato de la prueba
Agdia Inc., USA	Bt- Cry 1Ab, -Cry1Ac, -Cry1c, -Cry2A, -Cry3A, -Cry9C	DAS-ELISA
	DAS-ELISA	Immunostrips
Biogenetic Services Inc., USA	Cry 1Ab (Corn Mon809, 810, Bt 11, E-176)	ELISA (about 0.15% detection level)
	Cry9C (Corn CBH 351, Starlink)	ELISA (about 0.04% detection level)
	Cry1F (Corn Herculex)	ELISA
	CP4 (EPSPS Soybean RR)	ELISA (about 0.05% detection level)

Algunos kits de diagnóstico basado en ELISA

Compañía	Nombre del Kit	Formato de la prueba
EnviroLogix Inc., USA	Cry 1Ab & Cry1Ac in Bt corn and cotton	ELISA
	Cry2A, Cry1C, Cry1F, Cry3B and Cry9C in Starlink Corn	ELISA
	Cry9C	Quickstix (1 kernel in 800 in 5 min.)
Neogen Corporation, USA	CP4	Lateral flow assay (Soybeans 0.1%; corn 0.125%)
	Cry9C	Lateral flow assay (corn 0.125%)
Strategic Diagnostics Inc., USA	RUR Soya Meal, Soya Grain, Bt 1 Maize, Bt 9 Maize	ELISA



- ### Detección del ADN de los OVM
- La detección de una secuencia específica de ADN es uno de los métodos más utilizados para la identificación y cuantificación de OVM y sus productos derivados.
 - Los métodos que permiten la detección cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa de OVM.
 - Se emplea la tecnología de la PCR, ya sea en punto final (convencional) o en tiempo real.

Detección del ADN de los OVM

Factores intrínsecos de la muestra que afectan la amplificación:

- Integridad de ADN molde.
- Tamaño del amplicón.
- Presencia de sustancias inhibitoras.
- Proteínas.
- Otros: EDTA, NaOH, SDS y otros detergentes.

101

Detección del ADN de los OVM

Control de calidad del PCR:

- Controles positivos y negativos.
- Controles de extracción (blancos)
- Iniciadores (primers) validados.
- Todo el análisis realizado (al menos) en duplicado.

102

Detección del ADN de los OVM

Diseño de cebadores

103

Detección del ADN de los OVM

104

Detección del ADN de los OVM

PCR Multiplex

- Variación de la técnica de PCR en la cual se usan dos o mas sets de primers en un único tubo de mezcla.
- Tiene por objetivo lograr la amplificación simultánea de múltiples segmentos de ADN.
- Debe ser estandarizado.



105

Caso de detección de OVM empleando PCR Multiplex en el Perú




106

Detección del ADN de los OVM

Ventajas

- Alta sensibilidad, límites de detección \leq al 0,1% del ADN presente.
- El PCR semi-cuantitativo puede brindar un estimado aproximado del nivel de contaminación.
- El PCR en tiempo real puede proporcionar una cuantificación bastante precisa en un rango menor al 10%
- ADN altamente estable.

107

Detección del ADN de los OVM

Desventajas

- No todos los tejidos contienen la misma cantidad de ADN.
- Requiere facilidades e instrumentación de laboratorio relativamente avanzadas y personal altamente calificado.
- Costo más o menos alto.
- Puede demandar tiempo (generalmente más de 24 horas para tener resultados)
- Se deben tomar precauciones para evitar contaminación.

108

Algunos kits de diagnóstico basado en PCR

Compañía	Nombre del Kit	Matrices primarias
Applied Biosystems	TaqManR GMO Maize 355 Detection Kit	Alimentos e ingredientes procesados incluyendo harina, comidas, semillas, granos, tejidos de plantas y aceites.
Applied Biosystems	TaqManR GMO Soy 355 Detection Kit	Alimentos e ingredientes procesados incluyendo harina, comidas, semillas, granos, tejidos de plantas y aceites.
BioteCon Diagnostics GmbH	Round-up Ready Soya	Productos de la soya.
EnviroLogix	QualiPlate Kit for Roundup Ready Corn, Event 603 and Cotton	Roundup Ready corn, Roundup Ready cotton, Soybean and soy flour
EnviroLogix	QuickStix Kit for Roundup Ready Bulk Grain	Algodón RR, habas y canola

Evento t14/t25 liberty link maize (tolerante a herbicida)

Nucleic Acid - Based Method
For Exogenous Gene:

Strategy	Method Type	Primer Name	Amplicon	Probe Type	Validation Info	Standard
Screening	Qualitative	sF / sR	79bp			
		CM01 / CM02	220bp			
	Quantitative	T35S 1.5 / T35S 4.3	54bp			
		P35S 1.5 / P35S 1.3	161bp			
Gene-Specific	Quantitative	35S promoter_for / 35S-promoter_rev	68bp	TaqMan		
		P35S 1.5 / P35S1.3	161bp	TaqMan		
	Chip	T-35S_29.L / T-35S_29.R	134bp			
Construct-Specific	Qualitative	pat1.5 / pat1.3	161bp			
		2F / 2R	262bp			
	Quantitative	KVM.5 / KVM.6	69bp	TaqMan		
		T25 2.5 / T25 2.3	311bp			
	Quantitative	CM01 / PA01	450bp			
		P35S 1.5 / T35S 1.3	600bp			
		T25 1.5 / T35S 4.3	200bp			
		T26.F / T26.R3	299bp		Yes	ISO&National
		CM03 / PA01	231bp		Yes	National
		T25 1.5 / T25 1.3	149bp			
T25 1.5 / T25 1.3		149bp		TaqMan	Yes	National
T25.F / T25.R		63bp		TaqMan		
Event-Specific	Quantitative	89_12.L / 89_12.R	106bp	TaqMan		
		CM1 / repCM1	155bp	TaqMan		
	Chip	MLD143 / MDD551	Unknown	TaqMan	Yes	
		89_100.L / 89_100.R	149bp			

BMC Bioinformatics Database Open Access
GMDD: a database of GMO detection methods
 Wei Dong¹, Litao Yang¹, Kailin Shen², Banghyun Kim³, Gijs A Kleter⁴, Hans JP Marvin⁴, Rong Guo⁵, Wanqi Liang¹ and Dabing Zhang*



¿Porqué es importante el etiquetado de los alimentos ?

- Llevan información básica sobre el contenido de nuestros alimentos.
- Los consumidores tienen derecho a saber que están comprando o consumiendo.

Base Legal

- La Constitución Política del Perú en el Artículo 65° establece la defensa de los consumidores y usuarios, y garantiza el derecho a la información sobre los bienes y servicios que se encuentran a su disposición en el mercado.
- Ley 29571, Código de Protección y Defensa del Consumidor, Artículo 37° sobre *Etiquetado de Alimentos Genéticamente Modificados*: Los alimentos que incorporen componentes genéticamente modificados deben indicarlo en sus etiquetas.

Generalidades

- A nivel internacional se han implementado "niveles umbrales mínimos" para el marcaje de alimentos GM.
- En la Unión Europea, la "regulación umbral" específica que los productos alimentarios deben ser etiquetados como GM siempre que los ingredientes contengan productos derivados de organismos GM en una proporción superior al 0.9%.
- Deberán implementarse métodos eficientes para la detección en alimentos altamente procesados.

Legislación comparada: Brasil

- Decreto 4680 del 25 de Abril de 2003:

Art.2.-
 ...“(nombre del producto) transgénico”, “contiene (nombre del ingrediente o ingredientes) GM(s)”, “producto fabricado a partir de (nombre del producto) transgénico”...

Contenido de OVM: 4% - 1%



Legislación comparada: Brasil

Art.3.-
 ...“(nombre del animal) alimentados con la dieta que contienen ingredientes modificados genéticamente” o “(nombre del ingrediente) producido a partir de animales alimentados con piensos que contienen ingredientes modificados genéticamente.”

Legislación comparada: España

- Reglamento 178/2004 de la Ley 9/2003

Los operadores garantizarán que:

- a) En el caso de los productos pre-envasados la etiqueta contendrá la siguiente indicación: «Este producto contiene organismos modificados genéticamente», o bien: «Este producto contiene (nombre de los organismos) modificado genéticamente»

Legislación comparada: Otros

- **Australia – Nueva Zelanda:**
 “En la etiqueta se debe consignar, al lado del nombre del alimento o ingrediente, las palabras “genéticamente modificado”
- **Noruega:**
 “... debe estar etiquetado en Noruego y/o Inglés con las palabras “Contiene (nombre del organismo) genéticamente modificado” y/o “Contiene organismos genéticamente modificados”

Ejemplos: Unión Europea

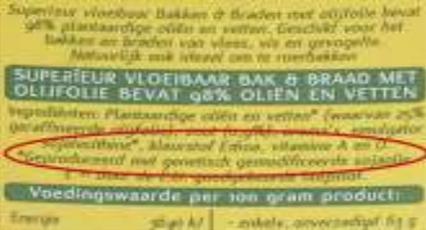
España



Específica que este producto ha sido producido con maíz no modificado genéticamente

Ejemplos: Unión Europea

Holanda



Etiquetado en la Unión Europea –Holanda, donde muestra que contiene aceite de soja genéticamente modificado

Ejemplos: Unión Europea



Francia

Nuevo Etiquetado de Carrefour creado sin OGM

121

Cuándo etiquetar

El etiquetado se efectúa:

- En base a Productos Finales
- En base al proceso de Producción

¿Cuándo hay que etiquetar?

- En cumplimiento de la ley
- El solicitante presenta solicitud
- Como condición de el otorgamiento del permiso
- Gestión de Riesgos

122

GRACIAS

Correo electrónico de contacto

eyglesias@minam.gob.pe

<http://pe.biosafetyclearinghouse.net>

123