

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR
TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

**TRABAJO PROFESIONAL
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO BIOQUÍMICO**

QUE PRESENTA:

ANA CRISTELL GÓMEZ DE LA CRUZ

CON EL TEMA:

**“DESARROLLO Y CERTIFICACIÓN DE UN MATERIAL DE REFERENCIA PARA UN
EVENTO TRANSGÉNICO EN TRGO (*Triticum aestivum*).”**

MEDIANTE:

OPCIÓN I

(TESIS PROFESIONAL)

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

NOVIEMBRE 2013

"2013, Año de la Lealtad Institucional y Centenario del Ejército Mexicano"

DIRECCIÓN
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 14 de noviembre 2013

OFICIO NUM. DEP-CT-254-2013

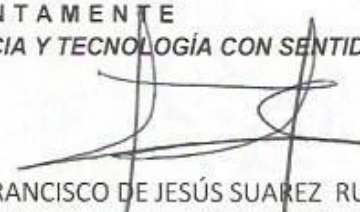
C. ANA CRISTELL GÓMEZ DE LA CRUZ
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
EGRESADA DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
PRESENTE.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. DRA. TERESA DEL ROSARIO AYORA TALAVERA, DR. JOAQUIN ADOLFO MONTES MOLINA y DR. FEDERICO ANTONIO GUTIERREZ MICELI En el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

DESARROLLO Y CERTIFICACIÓN DE UN MATERIAL DE REFERENCIA PARA UN EVENTO TRANSGÉNICO EN TRIGO

Registrado mediante la opción:
I (TESIS PROFESIONAL)

ATENTAMENTE
"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"


ING. FRANCISCO DE JESÚS SUÁREZ RUIZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

Vo. Bo.


M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO
DIRECTOR

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares
C.c.p.- Expediente
I'JLMN/I'FSR/I'eam



Secretaría de Educación Pública
Instituto Tecnológico
de Tuxtla Gutiérrez,
Div. de Est. Profesionales



Agradecimientos:

A Dios por darme la vida y el tiempo prestados, reconociendo que sin el nada podemos hacer. Expreso mis más sinceros agradecimientos a mis padres, Sr. Heray Gómez Vázquez y Sra. Laura de la Cruz Pérez por su apoyo invaluable y esfuerzo constante, a mi hermano William Gómez de la Cruz por su apoyo desinteresado, a mi tía Livia de la Cruz Pérez, quien siempre confió en mi y me dio su apoyo para forjarme.

Así mismo a la Dra. Teresa Ayora Talavera, asesora de tesis, por su apoyo e invaluable dedicación en la revisión de la presente, al doctor Federico Antonio Gutiérrez Miceli y al doctor Joaquín Montes Molina, que participaron en la revisión de la tesis y agradezco las sugerencias en la estructuración de este trabajo.

Agradezco a la Doctora Melina Pérez Urquiza, por aceptarme en este proyecto, su apoyo durante mi estancia e invaluable dedicación en la realización de la presente, también a la IBQ. Edna Alejandra Matúz Cundapí por sus consejos y sugerencias que contribuyeron en el desarrollo de este proyecto.

RESUMEN

Un material de referencia (MR) es un material que tiene una o varias propiedades bien establecidas. Los MR tienen varias aplicaciones y pueden usarse para determinar propiedades físicas y químicas. En este proyecto se desarrollaron tres materiales de referencia en estado sólido (harina de trigo seca) a los cuales se les asignó el siguiente nombre: DMR 496 I, DMR 496 II y DMR 496 III. El lote I es harina convencional, es decir no modificada genéticamente, el lote II es harina modificada con el evento de modificación DREB1 y el lote III es una preparación gravimétrica de ambas harinas con una concentración al 1.98%.

Para certificar cada uno de los materiales anteriormente mencionados, se debe cumplir con los requisitos de homogeneidad y estabilidad, los cuales se evaluaron empleando la técnica de PCR-rt, que se utilizará para la validación del método de detección empleando métodos estadísticos.

CUADRO DE CONTENIDO

Página

Lista de figuras	i
Lista de Cuadros.....	ii
CAPITULO I.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	2
1.3 OBJETIVOS.....	4
1.3.1. Objetivos específicos	4
CAPITULO II.....	5
ANTECEDENTES.....	5
2.1 Organismos genéticamente modificados.....	5
2.2. Ingeniería genética como herramienta biotecnológica.....	5
2.3 El trigo.....	7
2.3.1 Factores ambientales que afectan al crecimiento del trigo	8
2.3.2 El trigo como organismo genéticamente modificado.....	9
2.4 Legislación sobre los OGM	10
2.4.1 Evaluación de seguridad de los OGMs.....	12
2.5 Materiales de referencia.....	13
2.5.1 Tipos de materiales de referencia	13
2.5.2 Clasificación de los materiales de referencia.....	14
2.6 Definición del proyecto	15
2.6.1 Adquisición de los materiales de partida	15
2.6.2 Estudio de factibilidad	16
2.6.3 El tiempo y la vida de anaquel requeridos	16
2.6.4 Control de Calidad y Aseguramiento de Calidad (QC y QA).....	17
2.6.5 Producción de un material de referencia	18
2.7 Preparación del material	18
2.7.1 Estudio de homogeneidad de un material de referencia.....	18
2.7.2 Estudio de homogeneidad entre botellas.....	19
2.7.3 Estudio de homogeneidad dentro de las botellas	20
2.7.4 Estudio de estabilidad de un material de referencia	21
2.7.5 Certificación de materiales de referencia.....	22
2.8 Validación de un método.....	23
2.8.1 Descripción de los parámetros de validación.....	24
CAPITULO III.....	26

3.2. Diseño experimental para estudios de homogeneidad y estabilidad de candidatos a MR	26
3.2.1. Preparación del material candidato a material de referencia	27
3.2.2. Tratamiento del envase empleado	27
3.2.3 Molienda	27
3.2.4 Determinación de humedad	28
3.2.5. Preparación de gravimétrica.....	28
3.2.6 Asignación de un número de identificación.	29
3.2.7 Envasado del material.....	29
3.2.8 Tamaño de lotes producidos	29
3.3 Estudios de homogeneidad.....	30
3.3.1 Homogeneización de la muestra	30
3.3.2 Almacenamiento de las muestras.....	30
3.4. Extracción de ADN.....	30
3.5 Cuantificación de DNA mediante espectrofotometría UV-Vis	31
3.6 Amplificación de ADN	31
CAPITULO IV	34
4.1 Resultados de la preparación de 3 lotes candidatos a MRC	34
4.2 Estudios de homogeneidad.....	35
4.3 Limite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).	36
4.4 Coeficiente R^2	37
4.5 Eficiencia.	38
4.6 Repetibilidad y reproducibilidad.....	38
4.7 Incertidumbre	39
CAPITULO V	40
5.1 CONCLUSIONES	40
6. BIBLIOGRAFÍA.....	41

Lista de figuras

	<i>Página</i>
Figura 1. Diseño de homogeneidad entre botellas	19
Figura 2. Diseño del estudio de homogeneidad dentro de las botellas	20
Figura 3. Diagrama de flujo para certificar un candidato a MRC	23
Figura 4. Diseño experimental para estudio de homogeneidad y estabilidad del MR	27
Figura 5. Curva de calibración del logaritmo de la concentración en peso Vs Ct (Valores reportados en el PCR-rt).	37
Figura 6. Curva de calibración del logaritmo del número de copias Vs Ct.	38

Lista de Cuadros

	<i>Página.</i>
Cuadro1. Cantidad de muestras por lote.	29
Cuadro 2. Cantidad de frascos producido por lote.	30
Cuadro 3. Cantidad de muestras empleadas en la preparación de candidatos a MRC.	35
Cuadro 4. Resultados de determinación de humedad en termo-balanza.	35
Cuadro 5. Muestras seleccionadas para el estudio de homogeneidad.	36
Cuadro 6. Resultados de ANOVA (Análisis de varianza).	37
Cuadro 7. Valores de Ct obtenidos de las muestras	38
Cuadro 8. Resultados de repetibilidad y reproducibilidad	39

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

El Centro Nacional de Metrología (CENAM) ofrece diversos materiales de referencia certificados, los cuales se utilizan principalmente como patrones de medición de cantidad de sustancia; de aplicación en el ramo de alimentos, medio ambiente, salud, industria petroquímica y de cerámicos, de propiedades físicas (ópticas como: transmitancia, absorbanza y reflectancia espectrales en la región UV-Vis-IRC) y propiedades mecánicas (viscosidad y densidad).

Para la producción y certificación de materiales de referencia existen dos guías ISO, la guía ISO 34, Requerimientos Generales para la Competencia de los Productores de Materiales de Referencia, que establece los requerimientos que deben ser cubiertos para producir un material de referencia (MR) y demostrar competencia y la guía ISO 35, Certificación de Materiales de Referencia -Principios Generales y Estadísticos- establece las condiciones para realizar las pruebas de homogeneidad, pruebas de estabilidad y certificación de los materiales de referencia.

Los materiales de referencia certificados (MRC) deben cubrir ciertas características de importancia, dentro de las cuales se encuentra la estabilidad a corto y a largo plazo, ya que los MRC pueden ser inestables debido a su propiedad volátil; a la degradación por temperatura, luz, humedad, oxígeno, actividad microbiológica.

En éste trabajo, el objetivo principal es la preparación del trigo como material de referencia. El desarrollo del proyecto incluyó varias etapas como la preparación del candidato a material de referencia, la técnica empleada para determinar los eventos de modificación genética, fue la de PCR- tr (Reacción en Cadena de la Polimerasa, en tiempo real), a través de la cual se validó el método al tener resultados confiables, estimando las incertidumbres de las mediciones y para certificación del mismo.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Debido al uso de organismos genéticamente modificados (OGMs) en actividades como su liberación al medio ambiente, cultivo y en particular, su utilización en alimentos o ingredientes alimentarios, se ha desarrollado la estrategia de reglamentación por el gobierno mexicano, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas acciones pudieran ocasionar a la salud animal, vegetal y acuícola al ser liberado.

Los transgénicos se diseñan y construyen con el propósito de generar una nueva capacidad del organismo receptor, la cual reside en el material genético transferido. El objetivo de construir OGMs es ayudar en la solución de diversos problemas en diferentes sectores, para el bienestar de la humanidad; tales como: la producción de alimentos, biodiversidad y en la salud humana y animal.

La utilización y liberación al ambiente de los OGMs, ha despertado cuestionamientos, discusiones y procesos de revisión por expertos, creación de acuerdos internacionales y de legislaciones a nivel nacional. Uno de los acuerdos internacionales es el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), que entró en vigor en 1993. En este convenio se encuentra el compromiso de establecer un acuerdo sobre la seguridad de la biotecnología, por lo que se estableció el Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología del CDB que fue ratificado por México y entro en vigor el 11 de septiembre del 2003.

La ley como sistema normativo tiene la función de salvaguardar el orden y la propiedad en la sociedad, lo que apunta a su justificación mediante principios y argumentos basados en la moral para poder ser aceptada. Como lo establecen el Protocolo de Cartagena, la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y su Reglamento, es fundamental seguir y realizar evaluaciones de los posibles riesgos actuales y potenciales de los OGM y sus productos, caso por caso, a fin de garantizar un uso responsable de estos organismos, en beneficio de la salud humana, de la biodiversidad y del medio ambiente.

Mediante el Protocolo de Cartagena, los países firmantes se comprometieron a establecer las regulaciones y medidas necesarias para evaluar los movimientos transfronterizos de los transgénicos que pudieran tener efectos adversos sobre la conservación; y la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) tiene como objetivo garantizar la protección de la salud humana, del medio ambiente, diversidad biológica y de la sanidad animal, vegetal y acuícola, de actividades con OGMs. Entre los elementos que contiene se encuentra la definición de los principios y política de bioseguridad – como la evaluación caso por caso y paso por paso, con base en conocimiento científico; la determinación de competencias de diferentes dependencias gubernamentales; el establecimiento de las bases para el funcionamiento de la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM).

CENAM funge como laboratorio central de referencia, que es una condicionante para obtener los permisos de liberación al medio ambiente; por su carácter de laboratorio de metrología y experiencia en bioanálisis, CENAM fue propuesto por la CIBIOGEM como un laboratorio de metrología de referencia para su red de laboratorios, desarrollando métodos de medición, asegurando la calidad de las mediciones de los laboratorios.

1.3 OBJETIVOS

Desarrollar y certificar un Material de Referencia para la determinación de un evento de modificación genética en harina de trigo.

1.3.1. Objetivos específicos

- Desarrollar el material de referencia
- Validar la metodología de medición usando PCR - tiempo real
- Realizar estudios para la certificación del material: estudios de homogeneidad y estabilidad necesarios para la certificación.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 Organismos genéticamente modificados

Se ha introducido el término «organismos genéticamente modificados» (OGM) para describir a los organismos cuyo material genético se ha modificado de una forma que no se da en la naturaleza en condiciones normales de hibridación o recombinación natural (Querci, 2007).

El OGM en si debe ser una unidad biológica capaz de multiplicarse o transmitir material genético. Aplicado a los vegetales, el termino OGM se refiere a plantas en cuyo genoma (hospedador) se han introducido de forma estable uno o varios genes procedentes de otras especies, mediante técnicas de transferencia genética y cuando en la mayoría de los casos se ha comprobado que tales genes introducidos hacen que se obtenga un producto génico con mejores características. El proceso de introducir genes en especies no emparentadas y conseguir que funcionen se denomina transformación genética (Querci, 2007).

Existe un gran abanico en líneas vegetales modificadas genéticamente desplegado por partes en las regiones agrícolas del mundo; todos los cultivares actualmente sembrados son producto de la domesticación intensiva a partir de un estado silvestre original mediante la continuidad de la selección y la reproducción controlada para conseguir un producto más eficiente, resistente a las plagas, de una mayor calidad o de diferente aspecto (Querci, 2007).

2.2. Ingeniería genética como herramienta biotecnológica

Con la biotecnología moderna, la modificación o manipulación genética se realiza mediante métodos aplicados de la biología molecular, la llamada ingeniería genética; consiste en el traslado de genes completos o fragmentos especiales de ADN (que puede provenir de cualquier ser vivo), entre organismos de distintas especies, logrando que produzcan un nuevo gen, que

mejoran o regulan alguna o algunas actividades celulares. Esto se hace con un conocimiento bastante preciso de las funciones de los genes (o proteínas) que se movilizan, y por eso se dice que el organismo receptor es modificado genéticamente (GM), aunque continua siendo esencialmente la misma especie, raza o variedad. Gracias a estas técnicas, se han construido, utilizando la biodiversidad, innumerables OGMs útiles a la sociedad (Bolívar y Francisco 2006).

Las técnicas que utiliza la biotecnología moderna permiten la creación de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) o comúnmente denominados transgénicos y son creados artificialmente en laboratorios por técnicas de ingeniería genética. Las técnicas de ingeniería genética que se usan consisten en aislar segmentos del ADN (material genético) para introducirlos en el genoma (material hereditario) de otro, ya sea utilizando como vector otro ser vivo capaz de introducir fragmentos de ADN (*Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria), ya sea bombardeando las células con micropartículas recubiertas del ADN que se pretenda implantar, u otros métodos físicos como descargas eléctricas que permitan penetrar a los fragmentos de ADN hasta el interior del núcleo, a través de las membranas celulares.

En los vegetales, un fragmento de tejido o hasta una célula aislada, pueden dar origen a una planta completa de su mismo tipo por el proceso de regeneración. Si esta célula se modificó genéticamente, todas las células, tejidos y órganos regenerados llevarán una información nueva; así estas nuevas funciones se pueden manifestar en todo el vegetal o cultivo, o sólo en algunas partes de él. En el caso de plantas cultivadas, las variedades resultantes de la incorporación de uno o varios genes mediante técnicas modernas de modificación genética, se les llama cultivos genéticamente modificados (GM), aunque cada tipo individual (o evento) tiene propiedades específicas dependiendo del tipo de vegetal, el gen adquirido y el uso que se le da.

El clima es una de las causas de grandes variaciones de los rendimientos del trigo, pero existen muchas maneras de minimizar sus efectos, una de ellas

es la inserción de un nuevo gen. Otro factor ambiental desfavorable es la salinidad de los suelos. Algunas instituciones están trabajando sobre este problema: buscando variedades tolerantes y haciendo cruzamientos con especies emparentadas con el trigo y que portan tolerancia a la salinidad.

Actualmente ocho de cada diez países en desarrollo de los productores de trigo cultivan variedades importadas de otros países con resultados satisfactorios. Cerca de cada una de diez naciones que producen trigo usan variedades de trigo que ellos mismos han mejorado mediante la re-selección a partir de poblaciones exóticas de generación avanzada recibidas en el CIMMYT y de otros centros de investigación del trigo (Hanson, 1982).

2.3 El trigo

El término que se otorga al conjunto de cereales es *Triticum*spp, tanto cultivados como silvestres, que pertenecen al género *Triticum*; son plantas anuales de la familia de las gramíneas, ampliamente cultivadas en todo el mundo. La palabra trigo designa tanto a la planta como a sus semillas comestibles, tal y como ocurre con los nombres de otros cereales (María, 1981).

La palabra «trigo» proviene del vocablo latino *Triticum*, que significa 'quebrado', triturado' o 'trillado', haciendo referencia a la actividad que se debe realizar para separar el grano de trigo de la cascarilla que lo recubre. *Triticum* significa, por lo tanto, "(el grano) que es necesario trillar (para poder ser consumido)" (Belderok, 2000).

Se clasifica generalmente a los trigos de acuerdo a la especie, tipo comercial y hábito de crecimiento. Dentro del género *Triticum* se reconocen 16 especies de trigo, pero solo dos de ellas, *Triticum aestivum* y *Triticum durum* se cultivan en gran escala. El trigo harinero (*Triticum aestivum*) cubre cerca del 90 por ciento del área sembrada en todo el mundo y produce cerca de 94 % de la cosecha total mundial (Hanson, 1982).

El grano de trigo, es una semilla que está completamente rodeada por una cáscara o pericarpio. Las glumas (cascabillo) que durante el desarrollo de la

planta rodean las flores, tan solo en algunas especies de cereales queda más o menos unidas al pericarpio después de la madurez del grano; así ocurre en el trigo, en la avena, en el arroz y en la cebada, mientras que en el centeno y en el trigo, el grano maduro se desprende del cascabillo o se separa de él en las operaciones de la trilla. En el concepto morfológico y anatómico se distinguen en el grano de cereales: el germen (embrión), la zona del gluten o cuerpo farináceo (endospermo) y la cáscara, los cuales son órganos de composición química e importancia fisiológica completamente diferentes.

2.3.1 Factores ambientales que afectan al crecimiento del trigo

Las condiciones ambientales adversas, principalmente la sequía, representan la principal causa de pérdidas de productividad en los cultivos. El problema de la sequía se ha agravado en los últimos años en muchas regiones del mundo por el cambio climático y la desertización. La agricultura consume la mayor parte del agua del planeta, y en las regiones más áridas el uso de agua para la agricultura puede llegar al 90 por ciento de consumo. El desarrollo de cultivos más tolerantes a la sequía mediante ingeniería genética constituye una importante estrategia para enfrentar la demanda mundial de alimento con una menor cantidad de agua (Muñiz, 2011).

Los principales factores ambientales que afectan el crecimiento del trigo son los suelos salinos, efectos de la luz, temperatura y para ello se han implementado programas de mejoramiento genético, donde las nuevas variedades GM que ahora se están desarrollando contarán con características como la tolerancia a la sequía y el calor, una mejor calidad nutricional y el uso eficiente de nutrientes, y además nos proporcionarán alimentos más sanos (CIMMYT).

2.3.2 El trigo como organismo genéticamente modificado

Con el propósito de mejorar la tolerancia del trigo a condiciones de escasez de agua, se adoptaron varias estrategias, entre ellas, generar por medio de ingeniería genética variedades que contienen diversas construcciones genéticas que podrían mejorar el desempeño de las variedades en condiciones desfavorables (JIRCAS, 2007).

Los mecanismos moleculares de la respuesta a la escasez de agua se han estudiado principalmente en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, activando mediante una vía metabólica, al gen DREB (Ligamiento al Elemento de Respuesta a la Deshidratación), el gen *DREB* es un factor de transcripción que se unen al promotor *rd29A*, por lo que inducen la expresión en respuesta a la sequía, la sal y el frío (JIRCAS, 2007).

DREB ha sido sobreexpresado en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y el fenotipo resultante ha mostrado una sólida inducción de la expresión de los genes objetivo en condiciones favorables, la regulación de la expresión del gen *DREB* por mediación del promotor *rd29A* en condiciones desfavorables produjo plantas con mayor tolerancia al congelamiento, la sal y la sequía y sin cambios drásticos en el fenotipo normal de las plantas transformadas. Como parte de las actividades del CIMMYT para aumentar la tolerancia a la sequía en el trigo, JIRCAS, por conducto del Dr. Shinozaki, proporcionó el gene *DREB* de *A. thaliana* controlado por un promotor inducido por sequía, para probarlo primero en trigo y posteriormente en maíz (JIRCAS, 2007).

2.4 Legislación sobre los OGM

El uso de organismos genéticamente modificados (su liberación al medio ambiente, cultivo, importación y, en particular, su utilización como alimentos o ingredientes alimentarios) está reglamentado en la Unión Europea mediante un conjunto de procedimientos estrictos. Los primeros instrumentos jurídicos de la Comunidad (Directiva 90/220/CEE del Consejo y Directiva 90/219/CEE del Consejo) se publicaron en 1990 con el propósito de proteger la salud humana y animal y el medio ambiente (Querci 2007).

Con el reglamento sobre “alimentos nuevos” (novel feed and food) (CE) 258/97 del año de 1997 principalmente se regulaba la entrada en circulación de los OGM en la Unión Europea. De acuerdo con el reglamento los productos alimentarios de nuevo género se aprueban cuando:

- Su uso no represente un peligro para la salud
- No induzcan al consumidor a error en la elección del producto
- Se comporten en forma similar a los productos convencionales comparables
- En sus formas tradicionales y sustancialmente equivalentes.

Con el nuevo reglamento sobre nuevos alimentos e ingredientes alimentarios genéticamente modificados para el consumo humano y animal ahora se regulan exclusivamente los productos alimentarios provenientes de (o que contengan) OGM (Augsten, 2005).

Esto significa, que las reglas especiales para su autorización, denominación, indicaciones y requisitos para el etiquetado, son reglas especiales válidas que claramente se endurecieron con respecto al reglamento anterior de “alimentos nuevos“. De acuerdo a este nuevo reglamento los criterios más importantes para autorizar y etiquetar a los OGM son:

- Autorización de todos los nuevos productos por las autoridades competentes en el tema de la Alimentación de la UE, tanto los destinados al consumo humano como los destinados al consumo animal.

- Certificado de seguridad extendido por el solicitante.
- Transparencia a través de un registro público
- Indicación obligatoria en el etiquetado de determinados productos producidos a partir de OGM si estos contienen un porcentaje a partir del 0.9 por ciento de OGM, sin importar si los casos de contaminación se dieron de forma casual o si técnicamente no pudo ser evitada.
- Identificación de procesos: indicación obligatoria de los productos en los que, si bien no puede constatarse la presencia de OGM, hayan sido producidos con ingredientes que contengan OGM.
- Trato similar para el alimento destinado a animales, aunque no se declare si los animales de esos productos, consumieron o no OGM. (Augsten 2005)

Para atender la demanda de análisis generada por las actividades de monitoreo inspección y vigilancia de OGMs en el país, el SENASICA creó una entidad de referencia a nivel nacional con el objetivo de incrementar la capacidad de aplicar pruebas de detección, cuantificación, identificación y secuenciación de OGMs, actividades que se llevan a cabo en el Centro Nacional de Referencia en Detección de OGMs en México (SAGARPA, 2010).

El análisis de muestras para la detección de OGMs se divide en cuatro pasos:

- Recepción y registro de las muestras. Donde se asigna una clave de identificación única que permite seguir el proceso hasta la obtención de resultados.
- Acondicionamiento de muestra. Donde se separa la muestra para extracción de ADN y lo demás se guarda por 5 años de acuerdo al sistema de calidad del centro
- Extracción de ADN. Se obtiene los ácidos nucleicos de la muestra analizada
- Análisis de secuencias genéticamente modificadas mediante la técnica de PCR o PCR-RT. El análisis de secuencias consta de la detección, identificación y cuantificación. Los resultados son confiables, oportunos según la ley de bioseguridad (SAGARPA, 2010).

2.4.1 Evaluación de seguridad de los OGMs

Las evaluaciones de seguridad se centran de una parte, en la característica introducida y de otra, en el cultivo o alimento como un todo. De esta manera, se caracterizan el gen o genes insertados en el cultivo GM y se evalúa la seguridad de la proteína o proteínas resultantes (toxicidad y alergenicidad) (Metcalf, 1996). Igualmente, se analiza la expresión fenotípica, los caracteres agronómicos, el impacto sobre el medio ambiente y la equivalencia composicional para confirmar la aptitud alimentaria e inocuidad del cultivo o producto derivado de este (Monsanto, s.f, 2002.).

Es indispensable hacer una evaluación, comparando una contraparte conocida, generalmente su homólogo convencional que tenga un historial de utilización segura. Este concepto se conoce como enfoque comparativo o “equivalencia sustancial” y permite identificar las similitudes y posibles diferencias entre el alimento convencional y el nuevo producto.

En este proceso, el alimento derivado de un organismo genéticamente modificado es comparado con su contraparte convencional, permitiendo determinar si existen diferencias entre uno y otro y establecer los análisis y demás investigaciones necesarias para poder establecer la seguridad del alimento (Kuiper, 2001).

Para tener una mayor seguridad de los OGMs es indispensable realizar estudios como:

- Estudios de digestibilidad
- Estudios de toxicidad
- Estudios de alergenicidad

La valoración de la alergenicidad y la toxicidad de estos productos se determinan, de acuerdo a los lineamientos mundialmente validados y establecidos por la Organización Mundial de la Salud.

Adicionalmente, se llevan a cabo estudios relacionados con la composición nutricional, entre ellos: grasas, aminoácidos, proteínas, ácidos grasos, carbohidratos, minerales y contenidos de humedad.

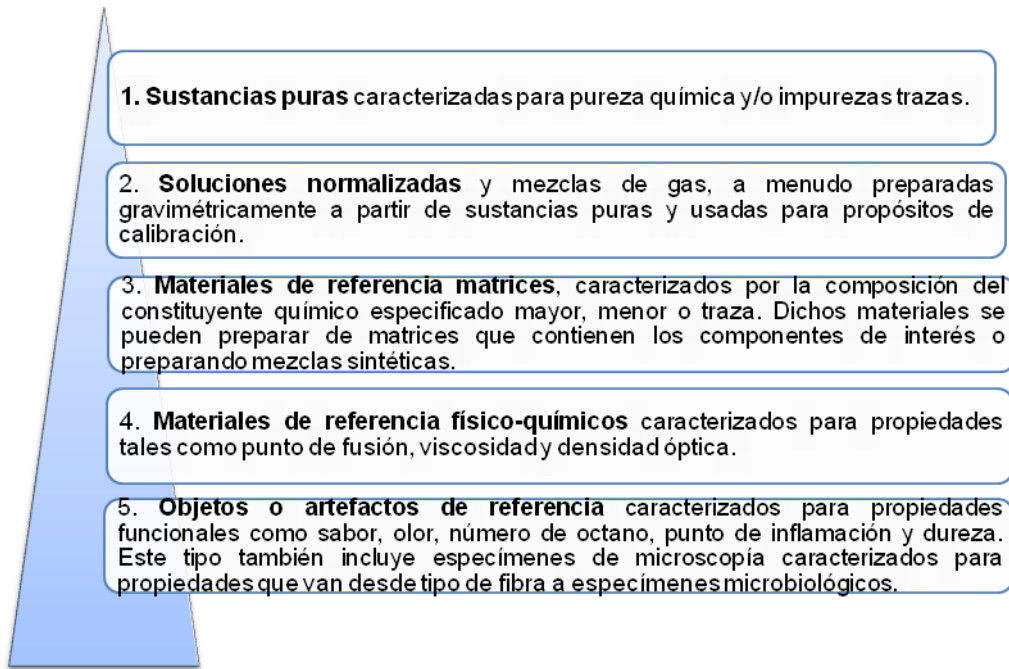
A través de estos estudios y los análisis mencionados, los comités nacionales determinan la seguridad de los productos genéticamente modificados.

2.5 Materiales de referencia

Los materiales de referencia (MR) y los materiales de referencia certificados (MRC) hacen posible la transferencia de los valores medidos o asignados de magnitudes (físicas, químicas, biológicas o tecnológicas) entre un lugar y otro. Ellos son ampliamente usados para la calibración de instrumentos de medición, para la evaluación de métodos de análisis o ensayos y para el aseguramiento de la calidad a largo plazo de las mediciones y, en el caso de ciertos materiales de referencia biológicos y tecnológicos, para permitir expresar convenientemente las propiedades en unidades arbitrarias. Todas las clases de MR y MRC están jugando un papel cada vez más importante en actividades de Normalización Nacional e Internacional, en ensayos de aptitud, y en la acreditación de laboratorios (NMX-CH-160-IMNC-2006).

2.5.1 Tipos de materiales de referencia

Se usan MRC para apoyar las mediciones relacionadas con composición química, propiedades biológicas, clínicas, físicas y de ingeniería así como áreas mixtas tales como sabor y olor. Ellos pueden caracterizarse para “identidad” (por ejemplo: estructura química, tipo de fibra, especies microbiológicas, etc.) o para “valores de propiedad” (por ejemplo, cantidad de entidad química especificada, dureza, etc.). Algunos tipos de materiales de referencia normalmente disponibles son los siguientes:

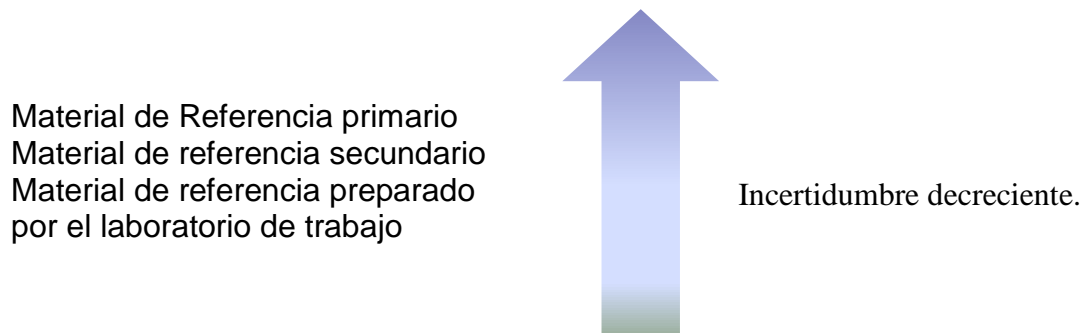


(ILAC-G9:2005)

2.5.2 Clasificación de los materiales de referencia.

Dos clases de materiales son reconocidas por ISO, denominados “materiales de referencia certificados” (MRC) y “materiales de referencia” (MR). Los MRC deben por definición ser trazables a una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad. Cada valor de la propiedad debe estar acompañado por una incertidumbre a un nivel de confianza definido. Los MR son materiales cuyos valores de la propiedad son suficientemente homogéneos y bien establecidos para ser usados en la calibración de un aparato, la evaluación de un método de medición o para asignar valores a los materiales.

Se pueden encontrar las clases siguientes de materiales de referencia:



2.6 Definición del proyecto

La planeación de un proyecto comienza con la definición del MRC que producirá, es decir que en todos los casos es importante especificar lo que va a ser producido. Los MRC se utilizan primordialmente para hacer las últimas mediciones trazables, la selección de las referencias apropiadas es crucial para el valor del MRC producido, tanto metrológicamente como comercialmente (NMX-CH-165IMNC-2008).

2.6.1 Adquisición de los materiales de partida

Una vez definido el problema y conociendo que material se va a ocupar, la tarea que sigue en un proyecto de certificación es obtener una suficiente cantidad del material para comenzar las pruebas. Para los materiales matrices, se debe observar, que en ocasiones no se contará con los valores de las propiedades que se ocupan, por lo que será necesario mezclar una o más matrices o técnicas puedan solucionar este problema (Díaz, 2007).

La cantidad de material necesario se selecciona de acuerdo a lo siguiente:

- El número de muestras del MRC que se requiere.
- La cantidad necesaria para un estudio de factibilidad.
- El número de muestras necesarias para la prueba de estabilidad y de homogeneidad.
- El número de muestras necesarias para la caracterización del MR con respecto a las características a evaluar en el patrón nacional de densidad.
- La cantidad de material necesario para la producción por lote.

El número requerido de muestras de un MR (candidato) es un asunto comercial y debe ser planeado cuidadosamente de antemano, esto para evaluar la existencia y el costo. Una variable importante es el número de muestras para ser distribuidas durante el tiempo de vida del MR. Como el tiempo de vida es una función intrínseca de la estabilidad, esta variable también afecta la cantidad de materia prima que se va a ocupar. Por ejemplo,

muchos materiales microbiológicos tienen estabilidad intrínseca limitada y pueden ser necesarias muchas más muestras para pruebas de estabilidad en el primer año, o a través del tiempo de vida del material (Díaz, 2007).

La selección del MRC debería tomar en cuenta no solamente el nivel de incertidumbre requerido para el propósito deseado si no también su disponibilidad, costo y conveniencia física y química para el uso propuesto. Por ejemplo, la falta de disponibilidad o alto costo de un MRC podría forzar al usuario a recurrir al uso de otro MRC de mayor incertidumbre que el preseleccionado. En conclusión, los MRC son importantes para satisfacer muchos propósitos. De acuerdo a esto, un MRC usado apropiadamente para un propósito en un laboratorio puede ser inapropiado para otro propósito en otro laboratorio (NMX.CH-163-IMNC-2006).

2.6.2 Estudio de factibilidad

Se debe considerar un estudio de factibilidad cuando haya preocupación por la factibilidad de producir y caracterizar un MRC lo suficientemente homogéneo y estable. Un estudio de factibilidad se organiza a veces para permitir a los laboratorios que probablemente participaran en la caracterización, se recomienda tener un lote ligeramente diferente del material usado para el candidato a MRC (NMX-CH-165-2008).

2.6.3 El tiempo y la vida de anaquel requeridos

El tiempo de vida previsto de un MR es una variable importante en la planeación del proyecto de la certificación ya que no es de utilidad un material que caduque en fecha temprana ni para el productor ni para el usuario. Además, otro parámetro relevante con respecto a la estabilidad es la vida útil del MRC. Dependiendo de la naturaleza de los mecanismos que afectan la estabilidad del material, pueden tomarse varias acciones para mejorar la vida útil y/o el tiempo de la vida. Existen varios factores que influyen en el tiempo de vida de un MR tales como las condiciones ambientales de almacenamiento, las condiciones de transporte, el manejo y el uso adecuado por el personal. La

información relevante de factores puede encontrarse en la literatura o puede obtenerse de los reportes internos del laboratorio (Díaz, 2007).

En muchos casos, la humedad juega un papel importante en los mecanismos que conducen a la inestabilidad de la matriz y/o de los parámetros. Se debe considerar en otros casos, la esterilización o pasteurización del material para detener la actividad microbiana; sin embargo, estas medidas también pueden tener un efecto negativo en la estabilidad. La vida de anaquel de un material es una función de las condiciones de almacenaje. Este determina en qué medida los resultados pueden ser extrapolados (NMX-CH-165-IMNC-2008).

2.6.4 Control de Calidad y Aseguramiento de Calidad (QC y QA)

Los MR deberían ser caracterizados con respecto a la homogeneidad, estabilidad, y el valor de la propiedad certificado. Para QC interno, sin embargo, el último requisito puede flexibilizarse, pero la homogeneidad y estabilidad adecuadas son esenciales. Requisitos similares se aplican a las muestras usadas para establecer cuanto coinciden o no las mediciones realizadas en laboratorios diferentes. En el caso de ensayos de aptitud, la homogeneidad es esencial y la estabilidad de la muestra dentro de la escala del tiempo del ejercicio debe evaluarse y controlarse. Aunque es deseable, el costo de asignar los valores de propiedad a muestras de ensayos de aptitud a menudo es prohibitivo y se usan en cambio y con frecuencia valores promedio de consenso. Como consecuencia, a menudo permanece alguna duda acerca de la confiabilidad de los valores asignados usados en los programas de ensayo de aptitud. Esto se debe a que, a pesar que el promedio de consenso de un conjunto de datos tiene valor, “la mayoría” no necesariamente son correctos y en consecuencia los valores tienen algún elemento no declarado de incertidumbre. La interpretación de los datos de ensayos de aptitud necesita por lo tanto efectuarse con cautela (ILAC-G9:2005).

2.6.5 Producción de un material de referencia

Es un proceso que se lleva a cabo para desarrollar lotes de materiales de referencia que se certificaran mediante la aplicación de métodos validos metrológicamente.

2.7 Preparación del material

Un material muestreado generalmente experimenta varios pasos antes de convertirse en material de referencia. Los pasos necesarios en este proceso incluye etapas como secado, reducción del tamaño de partícula, tamizado, estabilidad y embotellado. Durante la etapa de diseño del proyecto, debería ser establecido hasta qué punto debe extenderse la preparación de la muestra. Por ejemplo, es posible preparar un material muestreado de tal manera que pueda ser medido directamente como extracto. En muchos casos. Es preferible que la muestras deje el material muestreado en su estado original, aun cuando la heterogeneidad seria disminuida y la estabilidad seria aumentada como resultado del proceso de la preparación de la muestra (NMX-CH-165-IMNC-2008)

2.7.1 Estudio de homogeneidad de un material de referencia

Un estudio de homogeneidad es necesario en los proyectos de certificación por lote, para demostrar que el lote de muestras (unidades) es suficientemente homogéneo (NMX-CH-165-IMNC-2008). Cuando se requiera, el productor del material de referencia debe llevar a cabo una evaluación de la homogeneidad de cualquier candidato a material de referencia al analizar un número representativo de unidades elegidas en forma aleatoria, sistemática o estratificada. Esto debe realizarse por medio de un método de medición, cuya repetibilidad se ajuste al propósito requerido (es decir, lo suficientemente bueno para no contribuir de manera significativa a la incertidumbre combinada). El procedimiento de evaluación debe documentarse y realizarse de acuerdo con procedimientos estadísticos aceptados (NMX-CH-164-IMNC-2008).

Cuando sea adecuado, los valores de la propiedad a ser evaluados deberían medirse periódicamente, idealmente en un rango de medición de condiciones bajo las cuales el material será almacenado previo a su distribución al usuario. Se deben cuantificar los efectos de la luz, humedad, calor y tiempo con el fin de proporcionar consejos sobre el lugar de almacenaje y vida útil (y de aquí una fecha adecuada de expiración o de vida en anaquel adecuada) (NMX-CH-164-IMNC-2008).

2.7.2 Estudio de homogeneidad entre botellas

Un estudio de homogeneidad entre botellas ayuda a determinar la variación entre las mismas. Los “grupos”, representan las botellas (unidades). Dos escenarios experimentales típicos, para un estudio de homogeneidad entre botellas se visualizan en las figuras 1 y 2 (NMX-CH-165-IMNC-2008).

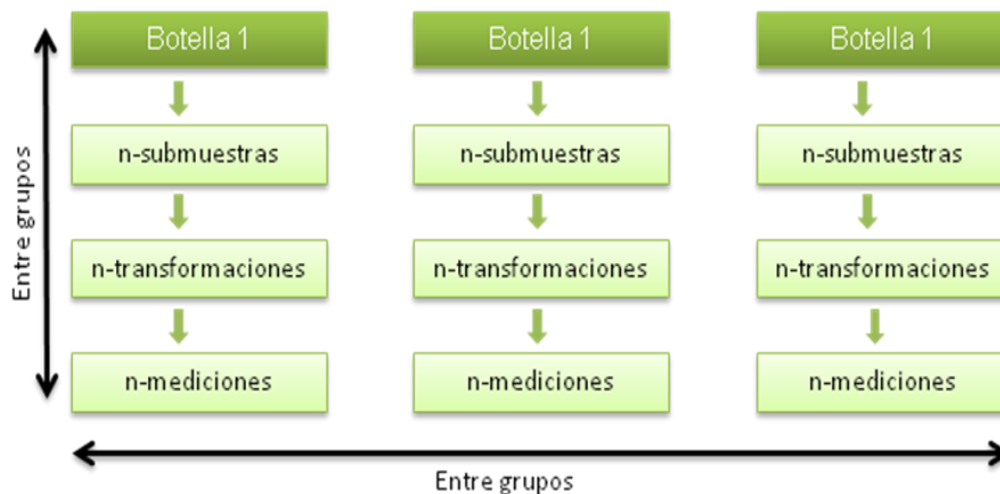


Figura 1. Diseño de un estudio de homogeneidad entre botellas.

En este diseño, ya que múltiples porciones se han tomado de cada muestra del lote y transformado individualmente, la varianza “entre botellas” solo incluye la heterogeneidad entre botellas, mientras que la varianza “dentro de botellas” incluye incertidumbre debido a la medición, la transformación del sub-muestreo. Esto es la situación desde una perspectiva de obtener un estimado no sesgado de la heterogeneidad del material (NMX-CH-165-IMNC-2008).

2.7.3 Estudio de homogeneidad dentro de las botellas

La homogeneidad entre botellas es una cuestión que solo surge cuando las botellas (unidades) del candidato a MR puede ser sub-muestreadas. En muchos casos, no es posible obtener una estimación exacta de la varianza debido a la heterogeneidad dentro de las botellas. La repetibilidad de los métodos de prueba se prolongará siempre y cuando sean contenidas en la estimación para la homogeneidad dentro de botellas.

En la figura 2, se muestran múltiples porciones de prueba de una muestra cuando usualmente se puede transformar solo una vez. Sin embargo, hay notables excepciones (por ejemplo el uso de fluorescencia de rayos X) donde es posible realizar múltiples mediciones sobre la misma porción de la muestra. En estos casos, la aproximación de ANOVA de una vía puede considerarse, tal como es el caso de la homogeneidad entre botellas. La desviación estándar relevante es la desviación estándar entre grupos donde un grupo representa una sub-muestra (NMX-CH-165-IMNC-2008).



Figura 2. Diseño de homogeneidad dentro de las botellas.

La toma mínima de muestra se determina llevando a cabo el estudio de homogeneidad dentro de las botellas para diferentes porciones de prueba. Como en la homogeneidad dentro de las botellas la desviación estándar depende del número de partículas que contiene cierta propiedad, siendo posible determinar el número mínimo de partículas (con mínima porción de prueba). Este mínimo es la cantidad de muestra más pequeña tomada, para la cual la desviación estándar de la porción de prueba es igual a la desviación estándar de la repetibilidad del método de medición (NMX-CH-165-IMNC-2008).

2.7.4 Estudio de estabilidad de un material de referencia

El material preparado debe ser estable en el tiempo, (se debe incluir la fecha de caducidad, si procede) así como ser susceptible para ser transportado. El cliente debe conocer durante cuánto tiempo permanece estable desde su recepción y desde que se abre el recipiente. La estabilidad se extiende a los parámetros certificados y a la matriz.

La prueba de estabilidad tiene como objetivo determinar el grado de inestabilidad del candidato a MR después de su preparación o para confirmar la estabilidad del material. Incluso los materiales “estables” pueden demostrar inestabilidad para uno o más valores de sus propiedades. Se puede hacer una distinción entre la estabilidad bajo condiciones especificadas:

- Las condiciones de almacenamiento (estabilidad a largo plazo), y
- Condiciones de transporte.

Como en el caso del estudio de homogeneidad, los aspectos del aseguramiento de la calidad son tan importantes como determinar las contribuciones a la incertidumbre debido a los efectos de la inestabilidad. La inestabilidad a largo plazo se refiere a la inestabilidad remanente de los valores de la propiedad del MRC bajo las condiciones de almacenamiento especificadas. Por lo tanto, es importante especificar estas condiciones de almacenamiento especificadas. Por lo tanto, es importante especificar estas condiciones adecuadamente para estudiar la estabilidad del material bajo las mismas condiciones. Una temperatura de referencia debe ser elegida de tal manera que es prácticamente cierto que el material es estable a esa temperatura. Muchos materiales de referencia biológicos y ambientales, muestran un cierto grado de inestabilidad, a pesar del esfuerzo puesto en definir y/o determinar las condiciones de almacenamiento óptimas (NMX-CH-165-IMNC-2008).

El estudio de estabilidad a corto plazo se lleva a cabo típicamente a diferentes propiedades del material. Las temperaturas de las muestras pueden

variar durante el transporte entre -50°C hasta + 70°C, dependiendo del tipo de modalidad del empaque y del transporte (NMX-CH-165-2008).

En el estudio de estabilidad se requiere un número considerable de botellas (unidades). Para cada punto en tiempo, es preferible tener disponibles más de una botella, dado que la mayoría de los estudios de estabilidad a largo plazo duran entre 24 y 36 meses, con típicamente 5 ó 6 puntos en tiempo, son necesarios por lo menos 10 ó 12 botellas por cada temperatura. Siguiendo el mismo razonamiento para un estudio de estabilidad a largo plazo, número de botellas sería entre 5 y 10 para un estudio de estabilidad acorto plazo de la estabilidad a cada temperatura (NMX-CH-165-2008).

El método preferido para conducir un estudio de estabilidad en la certificación de un lote es trabajar bajo condiciones de repetibilidad, de otra manera, la incertidumbre estimada debido a la inestabilidad crecerían innecesariamente por los efectos de la reproducibilidad en los resultados durante el ensayo de estabilidad (NMX-CH-165-2008).

2.7.5 Certificación de materiales de referencia

Un MRC está acompañado por un certificado que proporciona entre otras cosas la siguiente información:

- Las propiedades de interés
- Sus valores
- Sus incertidumbres
- Una declaración de trazabilidad metrológica con relación a los valores de propiedad.

El certificado del MRC es un resumen de un extenso programa de trabajo que involucra la selección del material, la evaluación idónea y la medición de las propiedades a certificar. En la figura 3 se esquematiza el procedimiento general para llevar a cabo la certificación de un candidato a

material de referencia (NMX-CH-165-IMNC-2008).

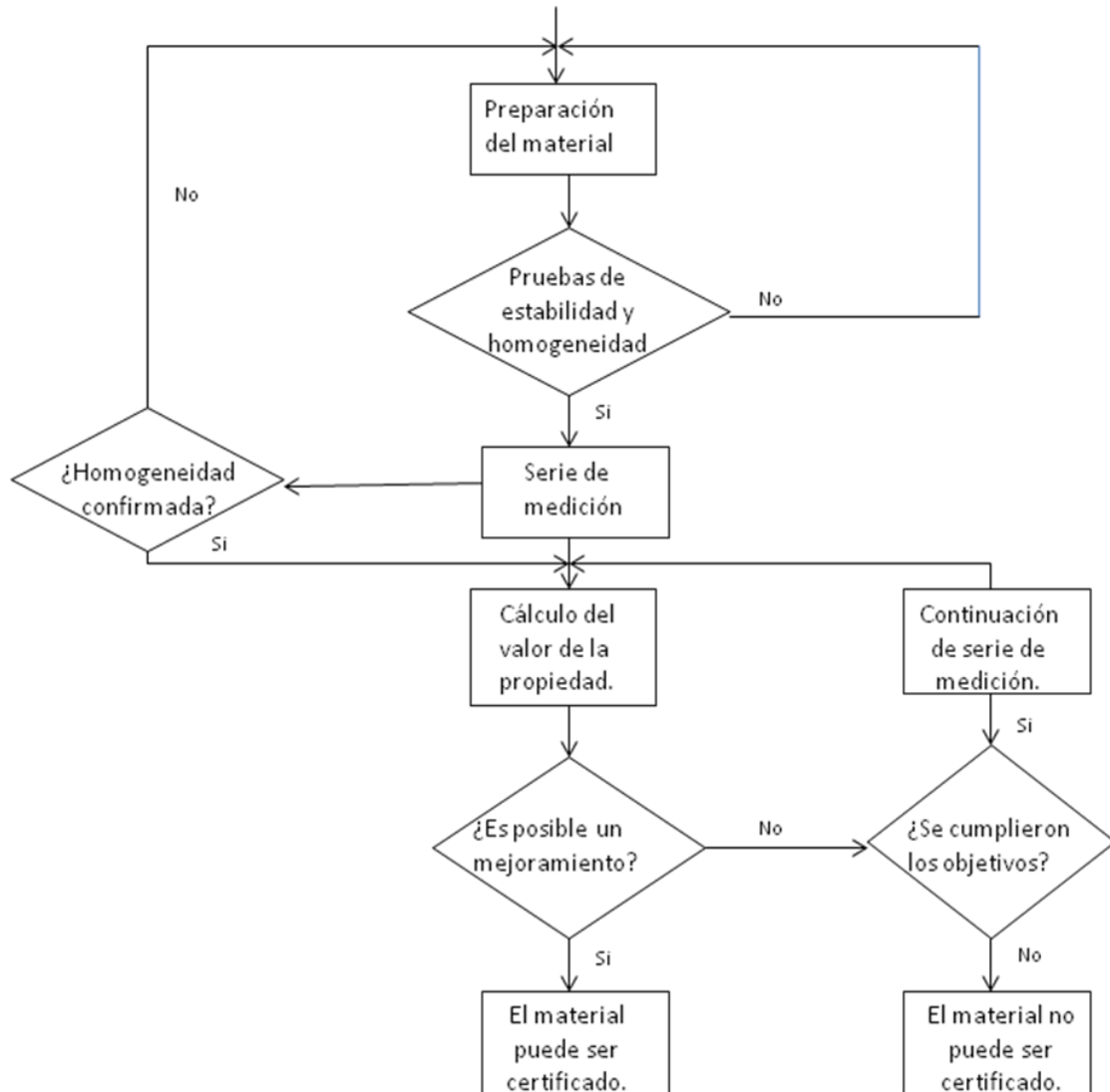


Figura 3. Diagrama de flujo para certificar un candidato a MRC.

2.8 Validación de un método

La validación examina las características de desempeño de un método para identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse del mismo cuando se aplique a un tipo específico de muestra.

El alcance de la validación o la revalidación requerida dependerá de la naturaleza de los cambios hechos al aplicar a un método a diferentes laboratorios, instrumentación, operadores y circunstancias en las cuales el método va a ser utilizado. Siempre es apropiado algún grado de validación, aun cuando se usan métodos aparentemente bien caracterizados ya sean de referencia o publicados (EURACHEM: 2005).

2.8.1 Descripción de los parámetros de validación

Límite de cuantificación. Estrictamente es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad, para ello se calcula con una serie de repeticiones con base en la desviación estándar y comprobar la repetibilidad donde se obtiene una medida de precisión (EURACHEM, 2005).

Límite de detección (LOD). Es el valor mínimo detectable de la variable de estado definida, el cual en química se traduce como “la concentración neta mínima detectable” (EURACHEM, 2005). El límite de cuantificación (LOQ) es la más baja concentración del analito que puede ser cuantificada en un ensayo con un nivel aceptado de exactitud (JRC, 2010)

Intervalo de trabajo e intervalo lineal. Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar los intervalos de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal; dentro de éste la señal de respuesta tendrá una relación lineal con la concentración del analito o del valor de la propiedad relacionada. La extensión de este intervalo puede establecerse durante la evaluación del intervalo de trabajo (EURACHEM, 2005).

Repetibilidad. Será expresada en términos de desviación, σ o S_r , del cual es útil calcular el límite de repetibilidad “r”, el cual permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre el análisis duplicado de una muestra determinado bajo condiciones de repetibilidad. Estas condiciones pueden ser (EURACHEM, 2005):

- El mismo procedimiento de medición
- El mismo observador
- El mismo instrumento de medición
- El mismo lugar
- La repetición dentro de un periodo corto de tiempo

Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos,

entonces es una medida de precisión más significativa a usarse es la reproducibilidad.

Reproducibilidad: el cual también se expresa en términos de desviación estándar, σ o S_r , del cual es útil calcular el límite de reproducibilidad "R" y será evaluado por el analista en cuanto a los resultados que obtendrá en variación de algún factor en su método notado que sus resultados no varíen siendo estos reproducibles (EURACHEM, 2005).

Para que un método sea reproducible pueden variarse cualquiera de las siguientes condiciones: el principio de la medición, el método, al analista, instrumento de medición, lugar, condiciones de uso o tiempo.

Criterio de aceptación. Para la desviación estándar de la reproducibilidad debe ser menor al 35% del objeto de concentración. Una desviación estándar de la reproducibilidad $< 50\%$ es aceptable para concentraciones menores al 0.2% (JRC, 2010).

Eficiencia de amplificación. Es la tasa de amplificación que conduce a una pendiente teórica de -3.2 con una eficiencia del 100% en cada ciclo. La eficiencia de cada reacción puede ser calculada siguiendo la siguiente ecuación (JRC, 2010)

$$eficiencia = \left(\left(10^{\left(\frac{-3.2}{m} \right)} - 1 \right) * 100 \right)$$

Coficiente R^2 es la correlación del coeficiente de una curva estándar obtenida de un análisis por una regresión lineal.

El criterio de aceptación para este parámetro es que el valor de R^2 debería ser ≥ 0.98 (JRC, 2010).

Incertidumbre de la medición es un parámetro único (usualmente da desviación estándar o un intervalo de confianza) que expresa el intervalo de posibles valores sobre la base de los resultados de medición. Una estimación de una incertidumbre de medición considera todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.2. Diseño experimental para estudios de homogeneidad y estabilidad de candidatos a MR

El diseño experimental consiste en preparar 3 candidatos a material de referencia, dos controles; uno negativo, un positivo y una muestra problema, empleando el evento de modificación *DREB1A* como candidato a material de referencia. Para llevar a cabo el proyecto “Desarrollo y certificación de un material de referencia para un evento transgénico en trigo”, es necesario seguir un procedimiento que cumpla con los requisitos establecidos en la norma NMX-CH-164-IMNC, en la figura 4, se muestran las etapas en las que se desarrolló el proyecto.

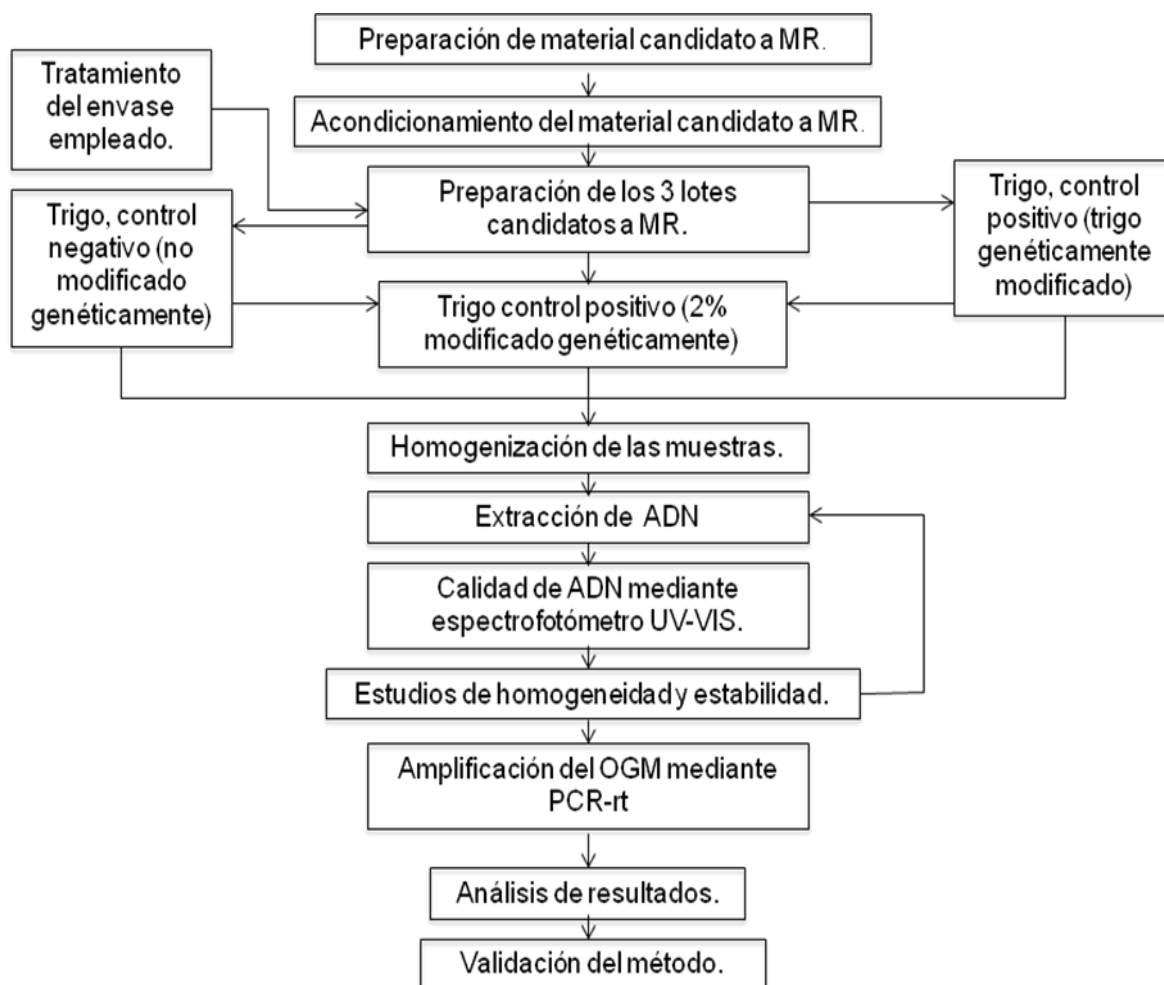


Figura 4. Diseño experimental para estudio de homogeneidad y estabilidad en MR.

3.2.1. Preparación del material candidato a material de referencia

Para la preparación de un candidato MR es importante conocer si cumple con los requisitos esperados, características como la representatividad, la homogeneidad y la estabilidad, son sus requisitos mínimos de calidad, además de las limitaciones. Para asegurar que cumple esas especificaciones, deben ser preparados siguiendo las indicaciones de la guía ISO 34 “Requisitos Generales para la Competencia de los Productores de Materiales de Referencia”. La función principal de los materiales de referencia es servir como base experimental para obtener mayor exactitud en sus medidas y asegurar su trazabilidad, es decir, para asegurar la calidad de los resultados.

3.2.2. Tratamiento del envase empleado

Se emplearon alrededor de 300 frascos de 5 mL color ámbar, los cuales fueron lavados 3 veces con agua tipo 1 y se rociaron con solución de etanol al 70 %. Después de secos los frascos, fueron esterilizados en un autoclave de usos generales modelo MQDE-2036-CA bajo las condiciones de 121°C a 20 psi durante 30 minutos. Finalmente los frascos se cerraron con sus respectivas tapas, se etiquetaron y se procedió al envasado del material de referencia (Observar el diagrama 1.1 en Anexo B).

3.2.3 Molienda

Antes de moler el trigo se eliminaron impurezas y se acondiciono el grano. Esté consiste en ajustar la humedad del grano; involucra también, un reposo de éste para que el grano se encuentre en óptimas condiciones (Hoseney 1991).

La preparación del candidato a material de referencia DREB1A (control positivo: con modificación genética y negativo: sin modificación), se realizó una reducción de tamaño, a través de un proceso mecánico, empleando un molino mezclador Spex modelo 8000. Se obtuvo un tamaño de partícula más homogéneo y se tamizó de tal manera que pudiéramos obtener un material en un intervalo de tamaño de partícula entre 150 y 425 micrómetros (usando la malla # 40).

Durante la molienda, se deben tomar precauciones para asegurar que el calentamiento del equipo no influya en la muestra, debido a que las temperaturas elevadas tienen un impacto negativo en la calidad del ADN extraído (ISO 21571, 2005).

3.2.4 Determinación de humedad

La harina se secó en un horno modelo 5831, a una temperatura uniforme de 60°C por 24 horas aproximadamente. Se determinó la humedad de la harina en una termo-balanza marca Mettler Toledo, colocando 2 gramos de la muestra, durante 10 minutos a 60 °C, el rango aceptable de humedad relativa es de 2 – 3 %, para evitar crecimiento microbiano, debido a que la humedad es un punto crítico en la elaboración del candidato a material, ya que la calidad del mismo, depende de la temperatura y humedad del ambiente en el que se almacene.

3.2.5. Preparación de gravimétrica.

Posteriormente al cumplimiento de los requisitos mencionados, se procedió a la preparación gravimétrica. Para pesar el material se empleo la balanza SARTOURIOS modelo ME 235S, y cada uno de los lotes se preparó en las siguientes cantidades:

Cuadro 1. Cantidad de muestra por lote.

No. de identificación	Harina modificada (<i>Convencional bobwhite</i>) (g)	Harina no modificada (<i>Triticum rd29a</i>) (g)	Concentración (%)	Cantidad aproximada de harina por lote (g).
DMR 496 Ia (control negativo)	97.89102		100%	97.89102
DMR 496 IIa (control positivo)		141.80202	100%	100
DMR 496 IIIa	Se desconoce la composición real de esta muestra			

Cada una de las muestras mencionadas se almacenó en frascos y se colocaron en un agitador rotatorio en el que se dejó 24 horas para homogeneizar las muestras.

3.2.6 Asignación de un número de identificación.

Para tener un control de todas las muestras, se solicitó a MRTC un número de identificación para cada material de acuerdo al procedimiento 600-AC-P.006. Los números asignados a los materiales son: **DMR 496 Ia**(Trigo, control negativo), **DMR-496 IIa**(Trigo, control positivo), **DMR-496I IIIa**(Trigo, muestra), las etiquetas se muestran en el anexo C.

3.2.7 Envasado del material.

Para el envasado, empleando un micro divisor rotatorio (Microriffler), dentro de una cámara de aislamiento con atmosfera de nitrógeno, dispensando aproximadamente 1 gramo de la muestra a cada frasco color ámbar de 5 mL, los cuales se esterilizaron previamente (ver diagrama 1.2 Anexo B).

3.2.8 Tamaño de lotes producidos

La cantidad de frascos producido por lote se encuentra en la siguiente Cuadro:

Cuadro 2. Cantidad de frascos producidos por lote.

Niveles	Concentración	No. de identificación MRC	Cantidad de frascos producido por lote.
1	0	DMR 496 Ia	1-96
2	100%	DMR 496 IIa	1-100
3	Muestra problema	DMR 496 IIIa	1-95

3.3 Estudios de homogeneidad

La homogeneidad se determinó por medición del evento de modificación genética DREB1 por PCR tiempo real, utilizando los Cts de la amplificación por PCR-tr. Para el estudio de homogeneidad se seleccionaron 10 muestras de acuerdo a la ISO GUIDE 35 y se muestra en la Cuadro 5.

Se realizaron 2 extracciones de ADN por cada frasco con la finalidad de evaluar la homogeneidad dentro de la muestra y entre muestras. De estas extracciones, se realizaron duplicados para la medición del DREB1.

3.3.1 Homogeneización de la muestra

El proceso de homogeneización, implica tener una muestra con una composición uniforme. Entre las muestras se encuentra el control negativo y positivo, los cuales se consideran harinas de composición uniforme, así mismo, es importante que el trigo muestra también sea uniforme. Para lograr este objetivo, cada una de las muestras se colocó en un agitador rotatorio para homogeneizar las mezclas y posteriormente envasar.

3.3.2 Almacenamiento de las muestras

El total de las muestras obtenidas en el desarrollo del proyecto, se colocó en hieleras, cada uno de los frascos fue sellado con cinta teflón y finalmente se almacenó en frío a una temperatura de $4^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, para evitar el un aumento de la humedad de la harina y un crecimiento microbiano.

3.4. Extracción de ADN

El proceso de extracción de ADN de las muestras se llevó a cabo mediante un kit comercial de Fast ID Genomic DNA extraction y el proceso se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Diagrama 1.5 en anexo B).

3.5 Cuantificación de DNA mediante espectrofotometría UV-Vis

A partir del ADN extraído se tomaron 3 muestras con sus respectivos duplicados para cuantificar la cantidad de ADN extraído, para llevar a cabo la cuantificación se empleó el espectrofotómetro UV-Vis modelo 4067 de la siguiente manera:

- Inicialmente se calibra el equipo con agua grado biología molecular a una longitud de onda de 260 y 280 nm.
- Elección de la cubeta, con un paso de luz de 10 mm.
- Colocar en la celda las muestras extraídas con sus respectivos duplicados
- Hacer tres lecturas por cada muestra y duplicados en los lotes DMR 496 la, Ila y IIIa.
- Independientemente de que los lotes la y Ila (control negativo y positivo respectivamente) se realizó la cuantificación por triplicado, para confirmar resultados (Diagrama 1.6 en anexo B).

3.6 Amplificación de ADN

Después de obtener el extracto de DNA de los tres lotes, se procede a la amplificación, para ello se prepara un coctel, el cual tiene los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad/Rxn
Primer Reverse	1 μ L
Primer Forward	1 μ L
H2O grado biología molecular	1 μ L
UMM	5 μ L
DNA	1 μ L
Vol. Total	10 μ L

Para la amplificación de las muestras, se usaron todos los reactivos mencionados, exceptuando que para el lote no modificado se utilizó los primers y sondas GETAcc y para la harina modificada los primers y sonda DREB1A. Todos los primers y sondas son diseñados para cada evento específico, es importante mencionar que no podemos mencionar la secuencia tanto del OGM

como del gen de referencia debido a que esta información es confidencial de CENAM.

Antes de iniciar la amplificación, se anotan todas las muestras a amplificar en un formato de amplificación, como el siguiente:

Fecha:				Descripción:								
Realizo:				Nombre del archivo:								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		496 III 55 24- 08 ACC										
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Este formato tiene 96 pocillos, el cual asimila una placa de amplificación, la cual nos ayuda a identificar cada una de las muestras que se colocaron en cada pocillo, proporcionando la siguiente información:

- Fecha de la amplificación
- Analista
- Nombre del archivo donde se guardaran los resultados de la amplificación
- Número de material, lote y numero de muestra
- Fecha de extracción de cada muestra
- Gen amplificado

Después de anotar las muestras, estas se colocan en la placa de amplificación de 96 pocillos, en donde se colocan los 9µL de coctel, se agrega 1 µL de la muestra a analizar, el llenado de la placa se inicia desde B1 (debido los cambios de temperatura a los que la placa es sometida, no permite que las muestras amplifiquen). Lista la placa de amplificación, se cubre con un

adhesivo marca AppliedBiosystems, con el cual se sella la placa y evitar evaporación en las muestras.

Lista la placa se somete al equipo PCR-rt , con el siguiente programa de temperatura: 50°C a 2 min, 95°C a 10 min, 45 ciclo 95°C a 15 s y 60°C, 1 min (Diagrama 1.3 en anexo B).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados de la preparación de 3 lotes candidatos a MRC

Se prepararon 3 lotes del material candidato a MRC con el evento de modificación DREB1A, primeramente se acondiciono la muestra, pasando por procesos como: molienda, tamizado, homogeneización y determinación de humedad. La cantidad de muestra empleada para cada lote se muestra a continuación:

Cuadro 3. Cantidad de muestra empleadas en la preparación de candidatos a MRC.

Muestra.	No. de identificación	Harina modificada (<i>Convencional bobwhite</i>) (g)	Harina no modificada (<i>Triticum rd29a</i>) (g)	Concentración (%)
C. Negativo	DMR 496 Ia (control negativo)	97.89102		100%
C. Positivo	DMR 496 IIa (control positivo)		141.80202	100%
NIVEL 1	DMR 496 IIIa	2	98.53598	1.98%

Un requisito importante en la preparación del candidato a material de referencia es la determinación de humedad; la cual se llevo a cabo empleando una termo-balanza marca Mettler Toledo, que indica la cantidad de humedad que contenían las muestras, y pérdida de humedad en las mismas. El equipo fue programado para determinar la humedad en un período de 10 min a una temperatura de 60°C, los resultados de humedad relativa se muestran a continuación:

Cuadro 4 Resultados de determinación de humedad en termo-balanza.

Muestra	Contenido de humedad (%)
DMR 496 Ia	1.9
DMR 496 IIa	2.2
DMR 496 IIIa	2.5

Como se mencionó anteriormente, el margen de humedad aceptable para muestras candidatas a material de referencia es de 2 a 3 %, por lo tanto, los resultados obtenidos indican que las muestras cumplen con este requisito y los resultados se encuentran dentro del rango señalado, para proceder a la preparación y desarrollo de los candidatos a material de referencia.

4.2 Estudios de homogeneidad

El estudio de homogeneidad permite conocer si el material es homogéneo, principalmente en la mezcla realizada entre trigo modificado y no modificado del lote IIIa. Las muestras seleccionadas de manera aleatoria son las siguientes:

Cuadro 5. Muestras determinadas para estudios de homogeneidad.

Muestras	Frascos para estudio de homogeneidad
DMR 496 Ia	002, 016, 026, 034, 045, 052, 064, 075, 085, 096
DMR 496 IIa	005, 018, 027, 037, 043, 055, 066, 078, 088, 099
DMR 496 IIIa	001,014, 023, 035, 047, 058, 069, 071, 083, 094

Para la evaluación del estudio de homogeneidad en las muestras, se hace análisis de varianza por medio de la anova (análisis de varianza) donde nos muestra si hay diferencia significativa entre las muestras tomadas de acuerdo a la ISO GUIDE 35. En el análisis de varianza las filas representan el estudio de homogeneidad dentro de botellas y en las columnas estudio entre botellas.

Para el candidato a material de referencia del 496 Ia, se analizaron las muestras: 002, 016, 026, 034, 045, 052, 064, 075, 085, 096 por duplicado en la extracción y se analizaron por triplicado para la amplificación por PCR-rt, usando los primers y sondas diseñadas especialmente para DREB1A; los resultados de la amplificación fueron “Undetermined”, lo que significa que no amplificaron las muestras para el evento de DREB1A, es decir que el trigo no está modificado genéticamente, por lo tanto se utilizó como blanco para este evento.

Para la evaluación de la homogeneidad en las muestras, se empleó el análisis de varianza (ANOVA) con la finalidad de identificar si hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tomadas, de acuerdo a la ISO GUIDE 35. En el ANOVA las filas representan el estudio entre botellas y las columnas dentro de las botellas. Los resultados de homogeneidad son:

Cuadro 6. Resultados de ANOVA

MATERIAL	ENTRE	F Calc.	F Cuadros	Criterio	Homogeneidad
DMR 496 IIa	Filas	0.6	3.7	Se acepta	✓
	Columnas	0.33	5.59		
DMR 496 IIIa	Filas	3.1	3.8	Se acepta	✓
	Columnas	1.1	5.6		

4.3 Limite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

El límite de detección determina la concentración más baja del analito que puede detectarse con el equipo, es decir, la sensibilidad del PCR-rt mostrando las cantidades mínimas en las que se puede encontrar el analito, y el límite de cuantificación permite conocer la concentración en la que se puede encontrar el analito y ser cuantificado por el equipo. En la validación es indispensable determinar un área de trabajo confiable, para ello se realizaron curvas de calibración en peso y número de copias.

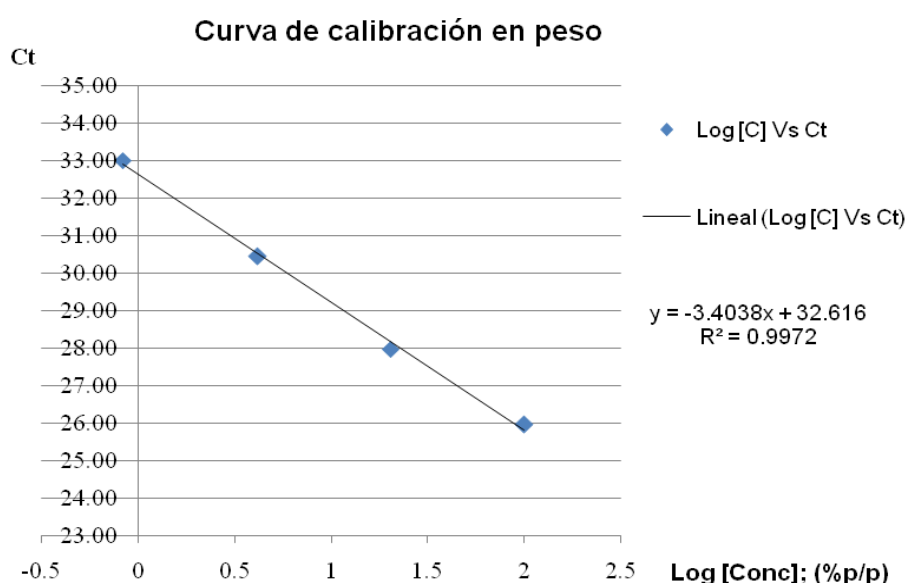


Figura 5 .Curva de calibración del logaritmo de la concentración en peso Vs Ct (Valores reportados en el PCR-rt).

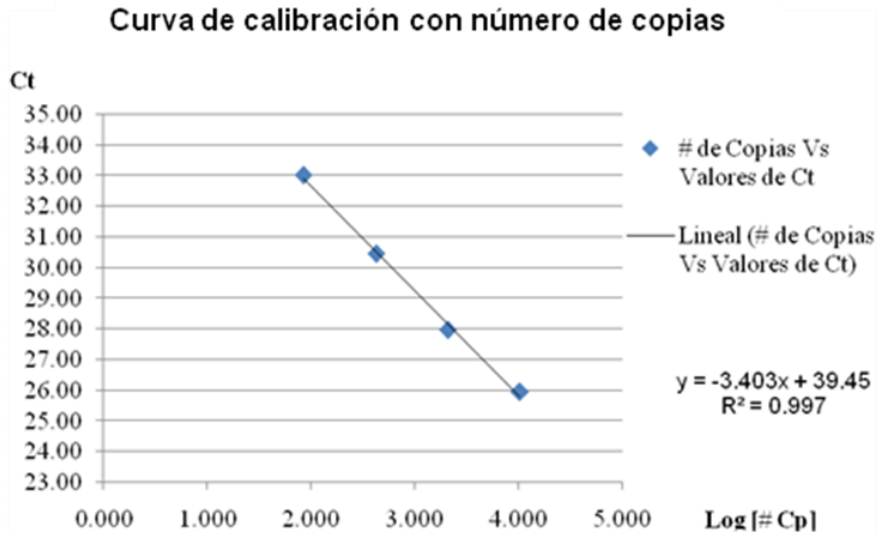


Figura 6. Curva de calibración del logaritmo del número de copias Vs valores de Ct.

Para ambas curvas de calibración se emplearon los siguientes resultados.

Cuadro 7. Valores de Ct obtenidos de las muestras.

Conc %	Log Conc	# Cp	Log # Cp	Ct 1	Ct 2	Ct 3	Promedio
100	2	11464	4.059	26.07	25.94	25.87	25.96
20	1.31	2317	3.365	27.94	28.00	27.99	27.98
4.1	0.62	475	2.676	30.44	30.46	30.43	30.44
0.8	-0.08	95	1.976	32.92	33.21	32.90	33.01

El límite de detección se encuentra en 0.08% debido a que el equipo reporta valores de Ct que son confiables

4.4 Coeficiente R²

Con este parámetro se obtiene la linealidad de la recta, la cual se obtiene mediante la hoja de cálculo. Para ambas curvas el criterio de aceptación debe ser mayor a 0.98. De esta manera se determina que en ambas curvas existe linealidad.

	R ²
CC en peso	0.997187
CC en número de copias	0.997187

4.5 Eficiencia.

La eficiencia representa la confiabilidad en el método, el cual está dado por la pendiente de la recta en la curva de calibración y demuestra la efectividad en la valoración del método. Las primer curva de calibración se graficó con el logaritmo de la concentración vs promedio del Ct; y la segunda grafica representa el logaritmo del número de copias Vs Ct. Los resultados de eficiencia de ambas curvas se muestran a continuación y estos cumplen con el criterio de aceptación en la validación del método

	Pendiente	Eficiencia (%)
Criterio de aceptación	- 3.1 ≥ pendiente ≤ - 3.6	$E = [10^{(-1/pendiente)} - 1] * 100$ E= 90-110 %
CC en peso	-3.403796	96.693319
CC en número de copias	-3.403800	96.693319

4.6 Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad permite conocer la confiabilidad de los datos obtenidos en una serie de muestras medidas bajo las mismas condiciones, es decir desarrollar este método varias veces teniendo los mismos resultados y la reproducibilidad indica la confiabilidad desarrollando el mismo método, modificando alguna variable, ya sean las condiciones del tiempo, temperaturas, instrumentos, equipos o alguna parte del método, etc.

A continuación se muestra la repetibilidad y reproducibilidad del método en cada lote, los datos se tomaron del análisis de varianza por cada lote.

Cuadro 8. Resultados de repetibilidad y reproducibilidad

DMR 496	R&R del método (%)	
	ACC	DREB
I	1.296	5.761
II	4.087	4.067
III	2.361	3.499

4.7 Incertidumbre

Para la determinación de incertidumbre se toman en cuenta las posibles fuentes de error desde la preparación del material hasta los resultados obtenidos en la amplificación, la incertidumbre para el material de referencia 496 IIIa es de 0.35%.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

5.1 CONCLUSIONES

Se desarrollaron tres lotes candidatos material de referencia, DMR 496 Ia, Ila, y IIIa, los cuales son aptos para certificar de acuerdo a los resultados obtenidos en la validación del método.

Como proceso de la certificación del material, se llevó a cabo un estudio nacional colaborativo, el cual está integrado por 14 laboratorios, con los cuales se compararon los resultados obtenidos.

Se concluye que las muestras son homogéneas, a través de un análisis de varianza, además de que las muestras cumplen con los parámetros de validación del método, tales como la eficiencia, coeficiente R², repetibilidad y reproducibilidad, los cuales se cumplieron, para el caso de los límites de cuantificación y detección, intervalos lineal y de trabajo, así como la recuperación, son datos únicos del material empleando el método de PCR-tr.

CAPITULO VI

6. BIBLIOGRAFÍA

- Augsten F, Boyle J, Brand U, Busaniche B, Drossou O, Heinz F, et al. (2005), ¿Un mundo patentado? La privatización de la vida y el conocimiento. Recuperado el 17 de junio de 2005 y Proviene de http://www.boell-latinoamerica.org/download_es/Libro_biopolitica.pdf
- Belderok B, Hans M & Dingena AD (2000). Bread-Making Quality of Wheat. Recuperado en septiembre del 2000, proviene de <http://www.amazon.com/Bread-Making-Quality-Wheat-CenturyBreeding/dp/0792363833>.
- Bolívar Z & Francisco G (2006). Biotecnología y Bioseguridad para el desarrollo de México. Recuperado en enero de 2006. Proviene de <http://www.juridicas.unam.mx/sisjur/saldyder/pdf/5-238s.pdf>
- Díaz JC (2007) Caracterización de líquidos para ser usados como Materiales de Referencia Certificados en densidad. Recuperado en febrero de 2007, Proviene de <http://www.cenam.mx/myd/tesis/Tesis%20caracterizacion%20de%20liquidos%20JCDJ.pdf>
- EURACHEM (2005) The fitness for purpose of Analytical Methods. Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. México: EURACHEM
- Guía Eurachem/CITAC (2000). Cuantificación de la incertidumbre de la Medición Analítica. Reino Unido: LGC.
- Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (2006). NMX-CH-161-IMNC-2006. Materiales de Referencia-Contenido de certificados y etiquetas. ISO Guide 31.
- Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (2006). NMX-CH-163-IMNC-2006. Materiales de Referencia- Uso de los materiales de referencia certificados. ISO Guide 33.
- Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (2006). NMX-CH-164-IMNC-2006. Materiales de Referencia- Requisitos generales para la competencia de productores de materiales de referencia. ISO Guide 34.
- Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (2008). NMX-CH-165-

- IMNC-2008. Materiales de Referencia- Principios generales y estadísticos para certificación- ISO Guide 35.
- INTERNATIONAL STANDARD (2005) Food – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Nucleic acid extraction. ISO 21571
- INTERNATIONAL STANDARD (2004) Foodstuffs – Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products – Protein based methods.ISO 21572
- INTERNATIONAL STANDARD (2006) Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – General requirements and definitions. ISO 24276
- ILAC-G9 (2005). Guía para la selección y uso de materiales de referencia (traducción). Australia: IAAC (Inter American Accreditation Cooperation).
- Japanese International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS) (2007) Recuperado el 5 de febrero de 2007, Proviene de http://apps.cimmyt.org/spanish/wpp/gen_res/dreb.htm
- María AP (1981) Manuales para educación agropecuaria: trigo, cebada y avena, México, D.F, Editorial trillas
- Metcalf, D. 1996. Evaluación del potencial alergénico de alimentos derivados de cultivos genéticamente modificados. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.36, 165-186.
- Monsanto.S.f. (2002) Maíz Roundup Ready (NK603) tolerante aRoundupy. Cuaderno Técnico. Buenos Aires. 62 p.
- Muñiz NM &Capiati DA (2011) Utilización de factores de transcripción como herramienta biotecnológica para incrementar la tolerancia a la sequía en plantas. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular. Recuperado el 5 de diciembre de 2011. Proviene de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v10n3/capiati.html>.
- Querci M, Jeremini M & Van Den EG (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos, Proviene de <http://gmotraining.jrc.it/>

6.2 ANEXOS

Anexo A. Glosario.

Certificación de un material de referencia: procedimiento que establece el(los) valor(es) de una o varias propiedades de un material o sustancia, por un proceso que asegura la trazabilidad a una realización exacta de las unidades en las cuales se expresan los valores de las propiedades, y que lleva a la emisión de un certificado.

Certificado de un material de referencia: es el documento que acompaña a un material de referencia certificado, donde se declaran uno o varios valores de la propiedad y sus incertidumbres y confirma que se llevaron a cabo los procedimientos necesarios para asegurar su validez y su trazabilidad.

Ensayo interlaboratorio: serie de mediciones de una o varias magnitudes llevadas a cabo independientemente por un cierto número de laboratorios sobre muestras de un material dado.

Error aleatorio: Resultado de una medición menos el resultado promedio de un gran número de mediciones repetidas del mismo mensurado (NMX-Z-055-IMNC)

Método de referencia: método ampliamente investigado, que describe clara y exactamente las condiciones y procedimientos necesarios para la medición de uno o varios valores de la propiedad en cual ha demostrado tener exactitud y precisión de acuerdo con su propósito de uso y que puede, por lo tanto, ser usado para evaluar la exactitud de otros métodos para la misma medición, permitiendo en particular la caracterización de un MR

Trazabilidad: propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón tal que estos pueden ser relacionados, con una incertidumbre indicada, con valores de referencia establecidos, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena interrumpida de comparaciones.

Patrón: medida materializada, instrumento de medida, material de referencia o sistema de medida destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o varios valores de una magnitud para que sirvan de referencia.

Patrón primario: patrón que es designado o ampliamente reconocido como poseedor de las más altas cualidades metrológicas y cuyo valor se acepta sin referirse a otros patrones de la misma magnitud.

Patrón secundario: patrón cuyo valor se establece por comparación con un patrón primario de la misma magnitud. La mayor parte de los materiales de referencia certificados (ver más adelante) se encuentran dentro de esta categoría puesto que la certificación de los valores de la propiedad está usualmente realizada por un procedimiento que es trazable a patrones primarios.

Patrón de referencia: patrón, en general de la más alta calidad metrológica disponible en un lugar o en una organización determinada, del cual se derivan las mediciones realizadas en dicho lugar.

Material de referencia (MR): material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y están bien definidos para permitir utilizarlos para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición, o la asignación de valores a los materiales.

Material de referencia certificado (MRC): material de referencia, acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad con una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad y para la cual cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con la indicación de un nivel de confianza.

Material de referencia interno: es aquél preparado por un laboratorio para su propio uso.

Trazabilidad: propiedad del resultado de una medición o de un patrón tal que pueda relacionarse con referencias determinadas, generalmente a patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones teniendo todas las incertidumbre determinadas.

ANEXO B

Anexo B. Diagramas de flujo.

Diagrama 1.1 Tratamiento de los envases para material candidato a MRC



Diagrama 1.2 Preparación de muestras candidatas a MRC.

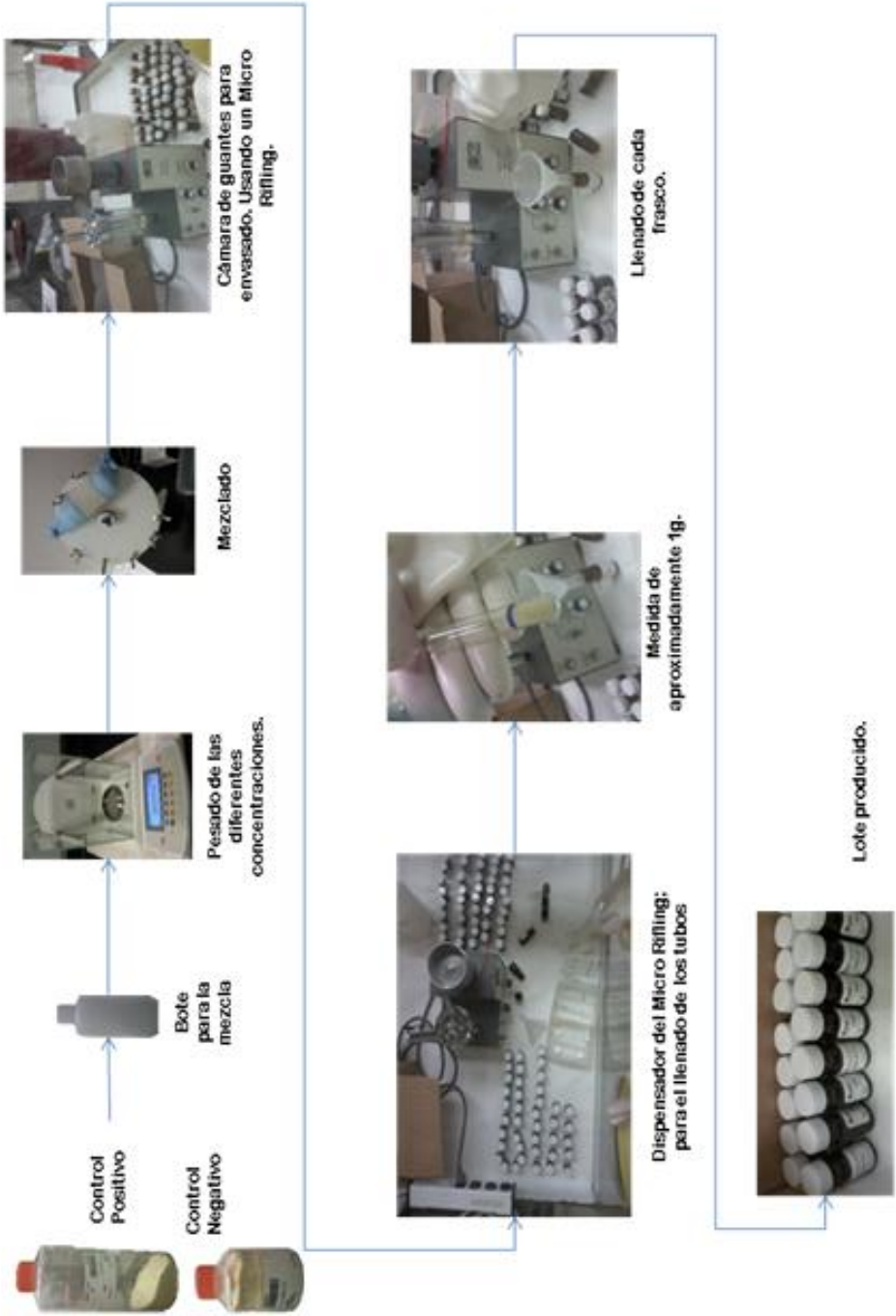


Diagrama 1.3 Amplificación de ADN

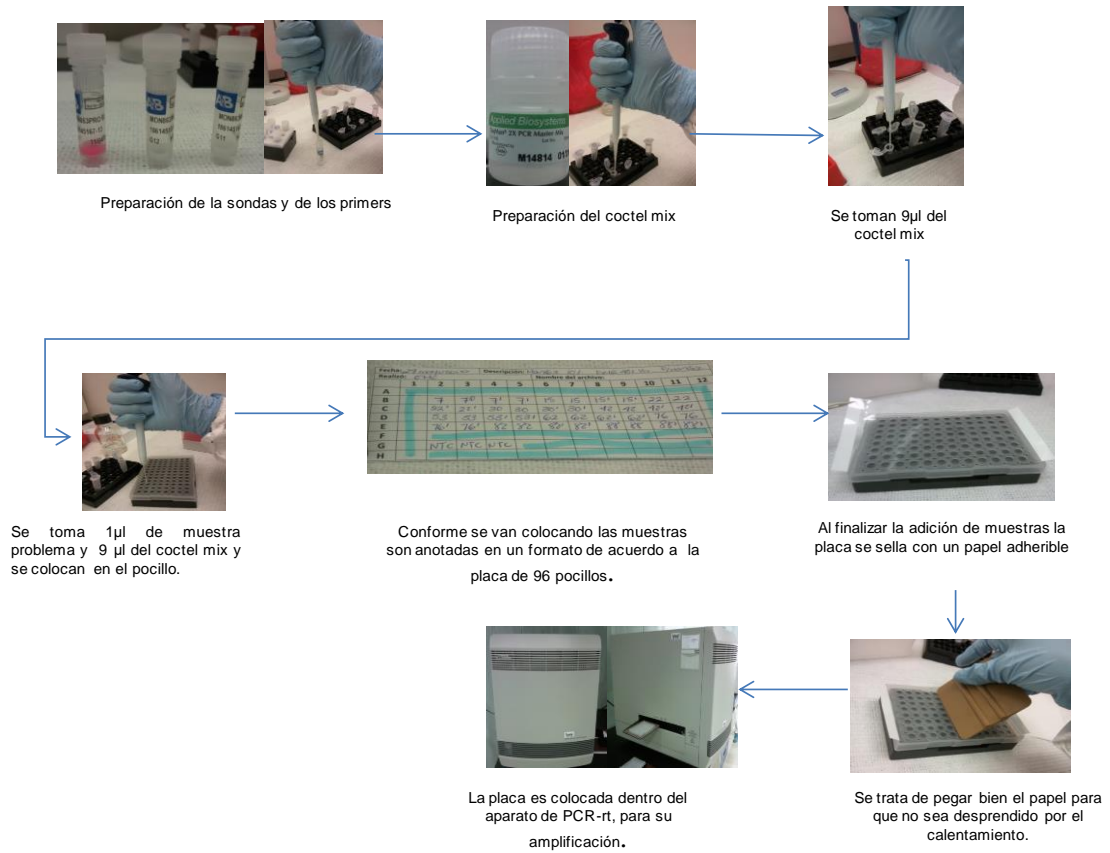


Diagrama 1.4 Pesado de la muestras para estudios de homogeneidad y estabilidad



Diagrama 1.5 Extracción de ADN con el Kit Fast Id Genomic DNA

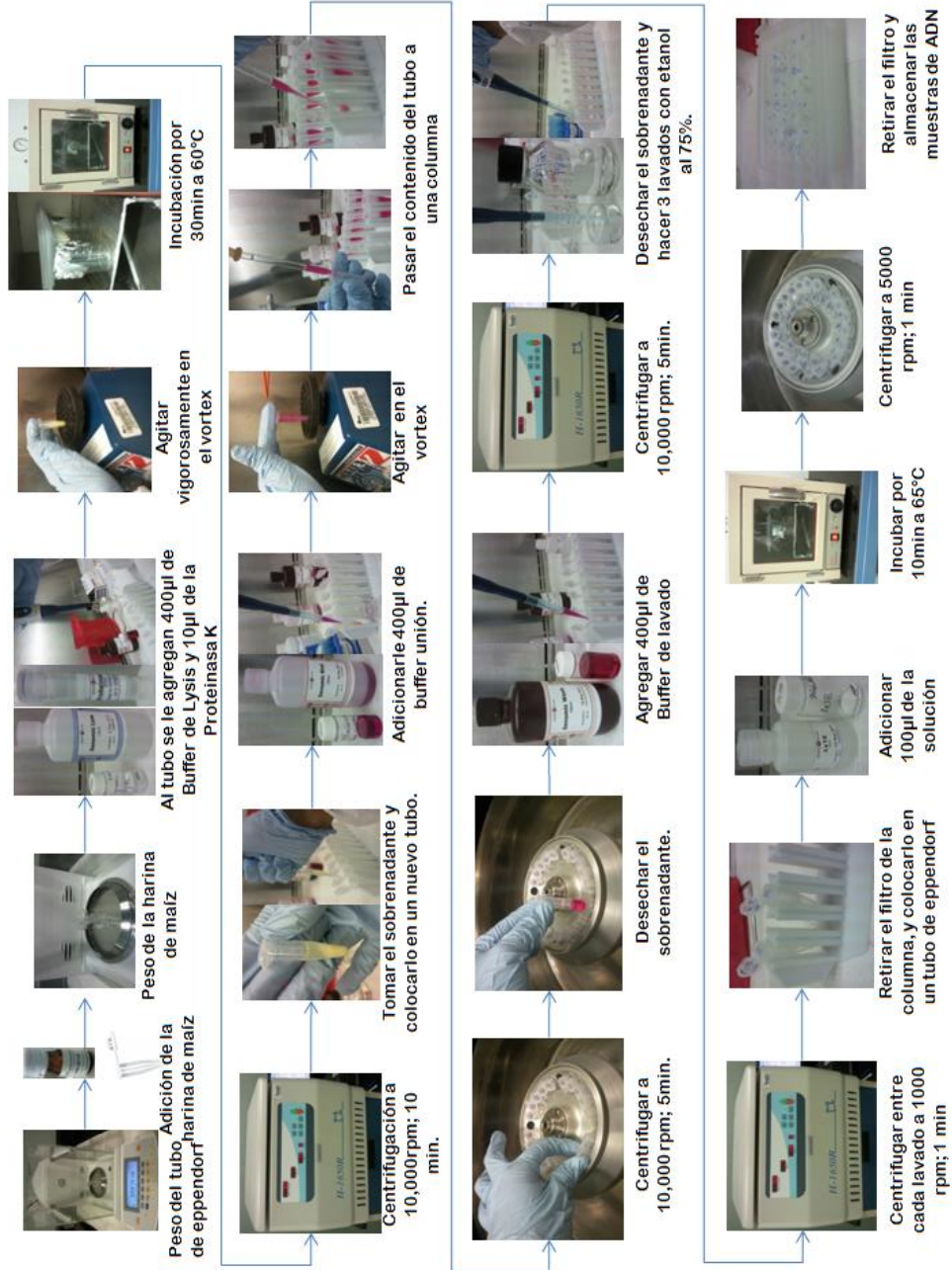
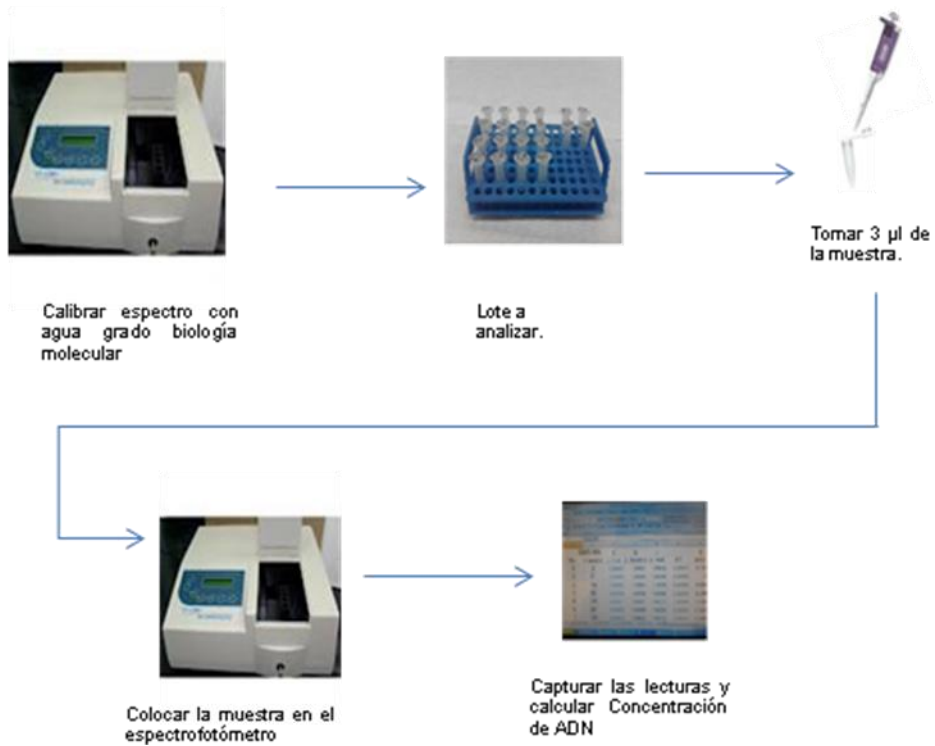


Diagrama 1.6 Cuantificación de ADN por espectrofotometría.



ANEXO C

Etiquetas para MRC

