

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

ANÁLISIS DEL EFECTO DE ALIMENTOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS EN EL MODELO DE *D. MELANOGASTER*

Bizzotto, Juan Antonio – LU 1036150

Licenciatura en Biotecnología

del Carre, Victoria Inés – LU 1024297

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Prada, Federico

Co-Tutores:

Cardozo, Julián

Nafissi, Julieta

Junio 7, 2016



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

Contenido

AGRADECIMIENTOS	1
ABSTRACT	2
RESUMEN	3
ESTRUCTURA DEL INFORME	4
1 INTRODUCCIÓN	5
1.1 ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS (OGM).....	5
1.2 ANTECEDENTES	14
1.3 MODELO BIOLÓGICO.....	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 RELEVANCIA DEL PROYECTO	20
3 HIPÓTESIS	22
4 MATERIALES Y METODOS	23
4.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN	23
4.2 PCR.....	25
4.2.1 PCR ESPECÍFICA DE PLANTAS: GEN DE LA LECITINA DE SOJA	26
4.2.2 PCR ESPECÍFICA DE PLANTAS: GEN DE LA ZEÍNA DE MAÍZ	29
4.2.3 DETECCIÓN DEL PROMOTOR CaMV 35S MEDIANTE PCR	31
4.3 TRABAJO CON EL MODELO BIOLÓGICO	35
4.4 OGM Y MEDIOS DE CULTIVO	36
5 RESULTADOS	41
5.1 IDENTIFICACIÓN DE OGM	41
5.1.1 PCR DE MAÍZ.....	42
5.1.2 PCR DE SOJA	45
5.2 ENSAYOS <i>IN VIVO</i> EN EL MODELO DE <i>DROSOPHILA</i>	47
5.2.1 ENSAYO DE PRODUCTIVIDAD	47
5.2.2 ENSAYO DE SUPERVIVENCIA.....	51
5.2.3 ENSAYO DE DEPRIVACIÓN DE ALIMENTO O STARVING.....	56
6 DISCUSIÓN	61
6.1 BIOLOGÍA MOLECULAR.....	61
6.2 MODELO BIOLÓGICO	62
6.3 RESULTADOS DE ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	63
6.4 SOCIEDAD Y PERCEPCIÓN DE LOS OGM	64
6.5 TRANSFERENCIA DE CONOCIMIENTO	65

7	CONCLUSIONES	66
8	BIBLIOGRAFÍA	67
9	ANEXOS	72
9.1	ANEXO I: CICLO DE VIDA DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	72
9.2	ANEXO II: EVALUACIÓN DE EQUIPOS Y REACTIVOS PARA PCR DISPONIBLES EN LOS UADE-LABS	75
	9.2.1 EVALUACIÓN DE REACTIVOS DE PCR EN LA FUNDACIÓN INSTITUTO LELOIR (FIL)	75
	9.2.2 EVALUACIÓN DE REACTIVOS Y TERMOCICLADORAS EN UADE LABS.....	78
9.3	ANEXO III: PROTOCOLOS DE MEDIOS DE CULTIVOS	80
9.4	ANEXO IV: SUPUESTOS ESTADÍSTICOS PARA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA DE T.....	81
9.5	ANEXO V: PCR PARA MUESTRAS ADICIONALES DE MAÍZ	85

AGRADECIMIENTOS

Quisiéramos agradecer a todos aquellos que formaron parte del proyecto, colaborando y aportando desde su lugar:

A nuestras familias, por apoyarnos a diario en todo aquello que emprendemos.

A los técnicos de laboratorio, Fernando Mendoliccio y José Ignacio Fernández, por habernos instruido en cómo manejarnos diariamente dentro de los laboratorios.

Al equipo del laboratorio del Dr. Pablo Wappner del *Instituto Leloir*, por su colaboración mediante el suministro de cepas de moscas.

A Paula Fernández, a María Carolina Martínez y Viviana Pedroarias, del Instituto de Biotecnología del INTA por su tiempo y su ayuda para la puesta a punto de la PCR.

A Andrea Llera y a Leandro Güttlein por su tiempo y el espacio para realizar las primeras PCR.

A nuestros co-tutores, Julián Cardozo y Julieta Nafissi, por apoyar esta iniciativa de investigación y por trabajar a nuestra par en el laboratorio, comprometiéndose plenamente con el proyecto.

Por último, quisiéramos agradecer especialmente a nuestro tutor y docente, Federico Prada, por haber respaldado el proyecto desde un comienzo, habernos guiado a lo largo de su desarrollo, y habernos permitido contar con su tutela y aprender de su experiencia y conocimientos en el área.

ABSTRACT

Genetically modified organisms (GMO) are those with any changes in their genome made by genetic engineering. There are many GMO crops in Argentina and many of them are used as raw material for most of the food we eat. In recent years there has been much controversy about the use of GMO-based foods, and new trends that strongly promotes the consumption of organic and GMO-free products.

Encouraged by this controversy and using the great versatility by *Drosophila melanogaster* (also known as "fruit fly"), this project aims to compare, if any, differences in this model due to the consumption of GM foods vs. organic. The main objective is to make a small contribution to the clarification of the dispute in society regarding this issue.

At the beginning, in order to verify the presence of transgenes in GMOs and the absence of these in organic, PCR assays were performed and it was possible to distinguish GMO grains from organic grains. This technique required a great deal of fine-tuning, which resulted in a technique for transgenes detection in the laboratory, available for use in future academic activities.

Starting with the initial hypothesis that in *D. melanogaster* the consumption of GM food does not produce significant difference in relation to a diet based on organic products, were carried out tests in which different variables were measured in that model. Among the variables studied include: productivity, survival and stress resistance (starving), they were measured in identical flies subjected to GM soy and organic soy (control) consumption.

Although the survival rate developments showed to be higher for flies fed with GMOs, in all tests performed there was no evidence that GM soy affects productivity, survival and stress resistance in flies.

With the results, it can be concluded that none of the variables studied in this work are negatively affected by eating GM products, also a diet based on organic products generates no advantage over those variables in the *D. melanogaster* model.

Finally it is proposed to continue research that will help to clarify this issue of great controversy today.

RESUMEN

Los organismos genéticamente modificados (OGM) son aquellos que poseen alguna modificación en su genoma producto de la ingeniería genética. En la Argentina existen numerosos cultivos de OGM y, muchos de ellos, son utilizados como materia prima de la mayoría de los alimentos que consumimos. En los últimos años se ha generado una gran controversia acerca del consumo de alimentos basados en OGM, de igual manera una nueva corriente impulsa fuertemente el consumo de productos orgánicos y libres de transgénicos.

Incentivado por dicha controversia y valiéndose de la gran versatilidad presentada por *Drosophila Melanogaster* (también conocida como “mosca de la fruta” o “mosca del vinagre”), este proyecto plantea comparar, si existiesen, las diferencias producidas en dicho modelo debidas al consumo de alimentos OGM vs. orgánicos. El principal objetivo es realizar un pequeño aporte al esclarecimiento de la disputa instaurada en la sociedad con respecto a este tema.

Con el fin de constatar la presencia de transgenes en OGM y la ausencia de los mismos en orgánicos, se llevaron a cabo ensayos de PCR logrando diferenciar claramente granos OGM de granos libres de transgénicos (orgánicos). Dicha técnica requirió de un gran trabajo de puesta a punto, que dio como resultado una técnica para identificación de transgénicos en el laboratorio, y disponible para ser utilizada en futuras actividades académicas.

Partiendo de la hipótesis inicial de que el consumo de alimentos elaborados a partir de OGM no produce cambios significativos en relación a una alimentación basada en productos orgánicos en el modelo de *D. melanogaster*, se llevaron a cabo ensayos en los que se midieron diferentes variables en el mencionado modelo: productividad, supervivencia y resistencia al estrés (*starving*). Las mismas fueron medidas en moscas idénticas sometidas al consumo de soja GM (genéticamente modificada) y de soja orgánica (control).

En los ensayos realizados en este trabajo no se encontraron evidencias de que la soja GM afecte la productividad, la supervivencia y la resistencia al estrés en moscas. Con estos resultados, se puede concluir que ninguna de las variables estudiadas se ven afectadas de forma negativa por el consumo de productos GM, así mismo una alimentación basada en productos orgánicos no genera ninguna ventaja con respecto a dichas variables en el modelo de *D. melanogaster*.

Finalmente se propone a partir de este proyecto continuar con investigaciones que ayuden al esclarecimiento de este tema de gran controversia en la actualidad.

ESTRUCTURA DEL INFORME

En el presente informe se incluyen una serie de apartados. En la *introducción*, se realiza una breve descripción de los *organismos genéticamente modificados (OGM)*, se describen los *antecedentes* ya publicados en relación al tema de estudio, y finalizando la sección se hace una breve introducción al *modelo biológico* utilizado en este proyecto. La siguiente sección continúa planteando los *objetivos* propuestos, mencionando la relevancia del proyecto con respecto a la temática abordada. El informe continúa con la presentación de la *hipótesis*, seguido por las *metodologías* que describen los materiales utilizados, los protocolos empleados y otros procedimientos experimentales. A continuación se presentan los *resultados* obtenidos en función de los ensayos realizados y el posterior análisis estadístico realizado con los datos obtenidos. La siguiente sección corresponde a la *discusión*, en la que se comentan brevemente los resultados obtenidos de las pruebas, indicando limitaciones y dificultades encontradas. La sección posterior a la discusión corresponde a las *conclusiones* finales del proyecto. En la *bibliografía* se citan los recursos literarios utilizados para el desarrollo de este proyecto final. Finalmente se incluye una sección de *anexos* conteniendo información adicional de los ensayos realizados.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS (OGM)

Un organismo genéticamente modificado (OGM) es aquella planta, animal, hongo o bacteria cuyo ADN ha sido modificado por técnicas modernas de manipulación genética con el fin de producir proteínas de interés industrial o bien mejorar ciertos rasgos, como la resistencia a plagas, la calidad nutricional, la tolerancia a heladas, entre otras características. Si bien el concepto moderno de alimento genéticamente modificado (GM), es lo que se entiende por un producto de técnicas de ingeniería genética, es importante destacar que el humano altera el genoma de las plantas y animales que lo rodean desde el comienzo de la agricultura. Los métodos tradicionales para el mejoramiento de plantas incluyen los cruzamientos selectivos (**Figura 1**) y la selección artificial (**Figura 2**), que se practican hace miles de años, y también la mutagénesis química o física en las últimas décadas.

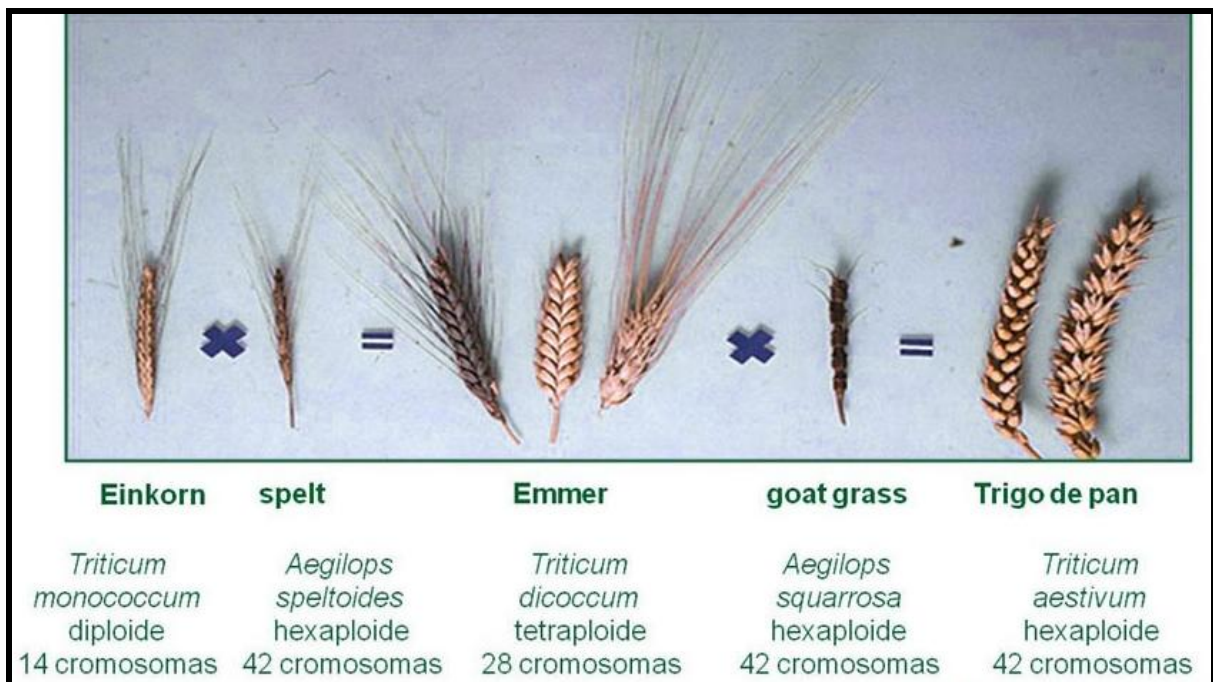


Figura 1. Cruzamientos selectivos de trigo. En la figura pueden observarse variantes originales de trigo: Einkorn y Spelt, muy antiguas, las cuales se cruzaron para obtener la variedad Emmer, con grano más grande, pero poco resistente al ambiente, por lo que se mezcló a su vez con el Goat Grass, mucho más resistente, obteniéndose el trigo con el que hoy se fabrica el pan. Esta variedad tiene el triple de cromosomas que su ancestro inicial. (Fuente: ChileBio - <http://goo.gl/Bw1hG6>)

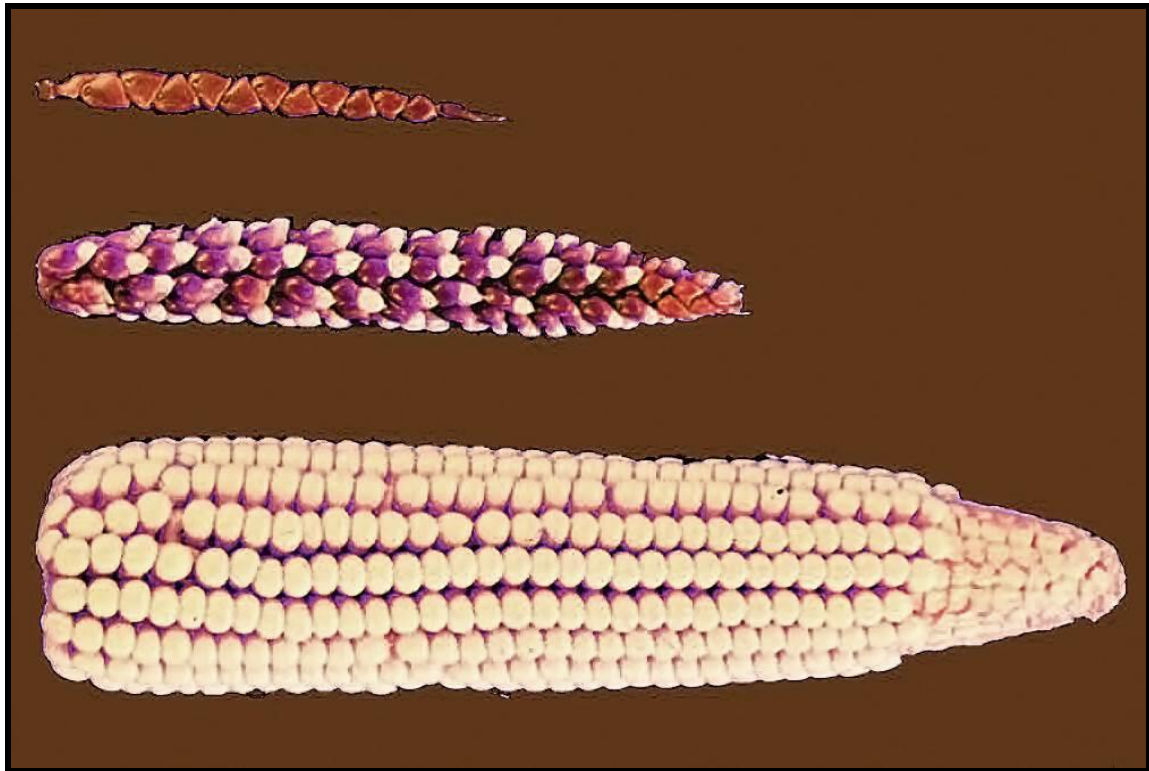


Figura 2. Selección Artificial - Evolución del teocintle al maíz moderno. Efectos de la selección artificial, proceso mediante el cual se han logrado variedades vegetales cuyos frutos tienen un rendimiento comestible para el hombre mayor que las variedades silvestres de las que proceden (Fuente: Gewin V (2003) Genetically Modified Corn)

Con el advenimiento de la ingeniería genética, llegó la capacidad aislar, copiar, editar y sintetizar ADN mediante técnicas de biología molecular y, consecuentemente, se logró transferir ADN de un organismo a otro para producir organismos mejorados o nuevos. Dicha tecnología, con el paso de los años, se utilizó para la modificación de bacterias, levaduras, animales y plantas (**Figura 3**). Los primeros ensayos de campo en plantas GM se realizaron a partir de 1986, obteniéndose 10 años después la aprobación de la EPA y de la FDA para la plantación comercial en Estados Unidos de cultivos productores de insecticida y resistentes al glifosato.

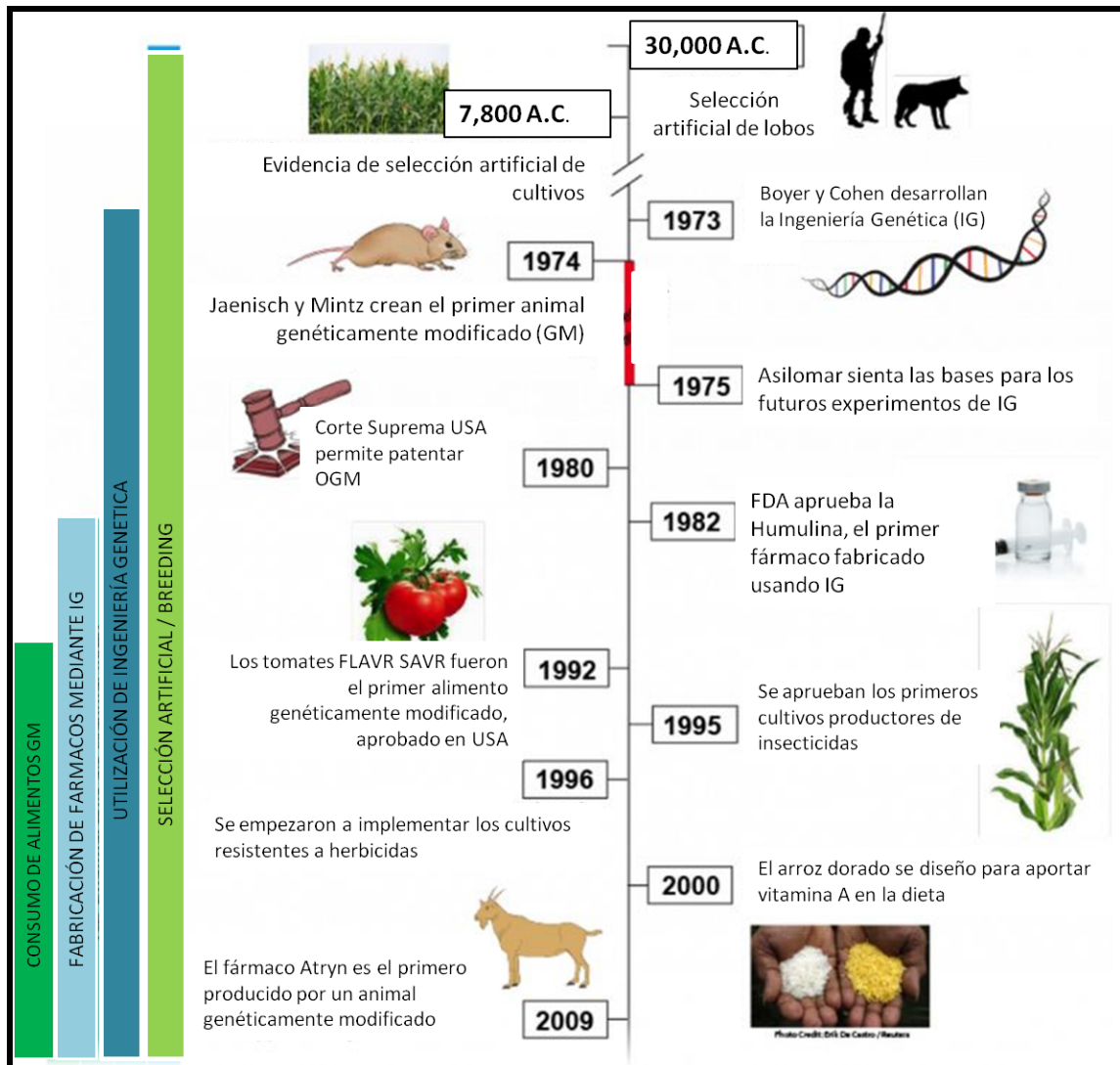


Figura 3. Línea de tiempo del impacto de la ingeniería genética en la generación de OGM. Desde la primera bacteria genéticamente modificada en 1973, el desarrollo constante de la ingeniería genética permitió el desarrollo de animales genéticamente modificados y variedades de arroz con precursores de beta-caroteno, para el consumo en zonas geográficas con dietas escasez en dicha vitamina. (Fuente: Genetic Literacy Project - <https://goo.gl/f5fxNU>)

Aunque comúnmente el término más nombrado es “alimento transgénico” para referirse a aquel que proviene de cultivos vegetales modificados genéticamente, es importante recalcar que también se utilizan dichas técnicas en productos no relacionados a la agricultura como puede ser la producción de insulina (Chance RE, Frank BH, 1993), enzimas para la fabricación de jabón en polvo, o aditivos para la elaboración y procesamiento de alimentos (Sundarram, A., & Murthy, T. P. K., 2014).

El empleo de la ingeniería genética o *transgénesis* en el mejoramiento vegetal es lo que se denomina agrobiotecnología o *biotecnología vegetal*. Sus objetivos consisten, fundamentalmente, en aumentar la productividad de los cultivos (Key S *et al*, 2008). La agrobiotecnología también se propone mejorar los alimentos que derivan de los cultivos vegetales, eliminando sustancias tóxicas o alergénicas, modificando la proporción de sus componentes para lograr alimentos más saludables o aumentando su contenido nutricional (Paine, J. A. *et al*, 2005). Otra aplicación de la biotecnología vegetal es el empleo de las plantas como biorreactores o fábricas para la producción de medicamentos, anticuerpos, vacunas, biopolímeros y biocombustibles (Xu, J. *et al*, 2011).

Las técnicas de transgénesis, en contraste con las técnicas tradicionales, permiten insertar un único gen (procedente de otra planta u otra especie) y saber todas las modificaciones que se producen en el organismo. Por otro lado, las técnicas de mutagénesis o cruzamientos selectivos generan intercambios o alteraciones en grandes cantidades de genes. **(Figura 4)**. Sin embargo las técnicas tradicionales no tienen regulaciones legales tan estrictas, ni han sido sometidas al nivel de escrutinio científico que se observa con los OGM. Del mismo modo, la actual incertidumbre por los alimentos transgénicos es mucho mayor que la que alguna vez se tuvo por los alimentos obtenidos por técnicas tradicionales de modificación genética.

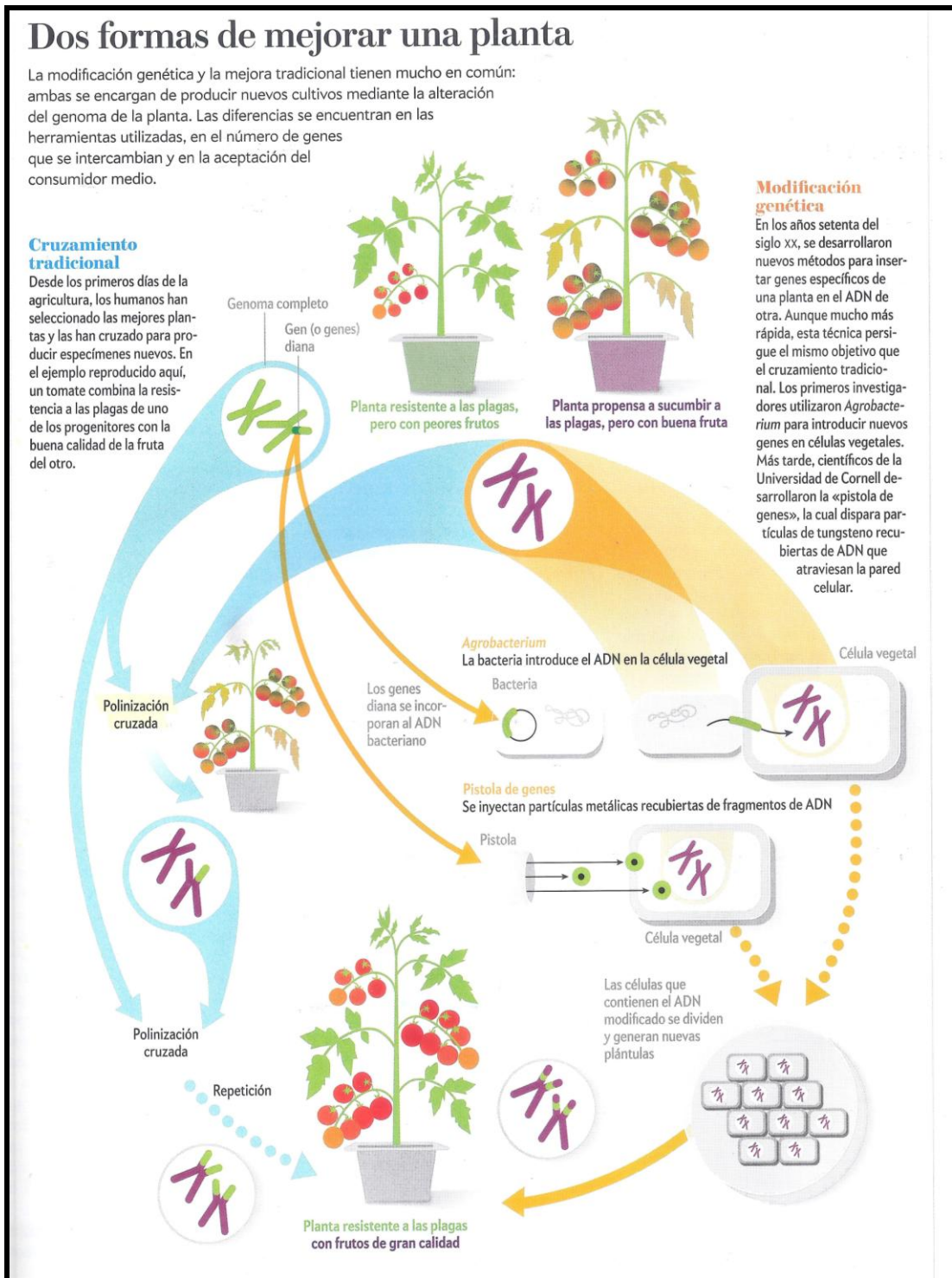


Figura 4. Formas de mejorar una planta. Descripción: las técnicas tradicionales generan grandes cambios en el genoma, y por más que el fenotipo obtenido sea el deseado (tamaño, color, gusto, etc.) no se tiene conocimiento de todos los cambios que sufre el genoma de la planta. La transgénesis ofrece un control más estricto de las modificaciones, y un conocimiento más amplio del producto final. (Fuente: Scientific American - <http://goo.gl/lm9HVj>)

Actualmente, la preocupación sobre los alimentos en una población en crecimiento exponencial y la influencia de la alimentación de calidad en la salud, generan un gran interés en la sociedad y en los medios de comunicación. Las potenciales ventajas de los alimentos GM (Ej.: mejoras nutricionales, reducción del uso de insecticidas, resistencia a sequías y mayor rendimiento) se ven contrastadas siempre por la incertidumbre frente a cómo podrían afectar la salud y el medio ambiente en el mediano y largo plazo. Entre los temas de discusión más recurrentes se encuentran:

- Etiquetado de productos que contienen OGM. (<http://goo.gl/CVCUim>)
- Adopción de los cultivos genéticamente modificados en diferentes países. (<http://goo.gl/iRN9KQ>)
- Beneficios económicos del sector agropecuario al adoptar cultivos transgénicos. (<http://goo.gl/CRb1TN>)
- Utilización de herbicidas que complementan a los OGM. (<http://goo.gl/TkjSKG>)



Figura 5. Publicaciones recopiladas durante la duración del trabajo que discuten tecnología de los alimentos. La perspectiva de 9.000 millones de habitantes para el año 2050, despierta muchas inquietudes sobre el mejor método para alimentar a tantas personas. Las publicaciones graficas reflejan las dudas de parte de la sociedad, frente a la solución que pretenden ser los OGM.



Figura 6. Revistas extranjeras que debaten acerca de los alimentos transgénicos. De izquierda a derecha: revista Time: “El arroz dorado podría salvar un millón de niños por año... esto se logró mediante una modificación genética... ¿vale la pena el riesgo?”, Revista Time: “La lucha de la comida”. Revista The Village Voice: “La amenaza de Monsanto”

Desde 1996, el año de la primera plantación comercial de OGM, más de 60 países han comenzado a plantar o importar cosechas producto de la biotecnología. En 2014, 28 países plantaron 181.5 millones de hectáreas, 100 veces más que en 1996. Otros 39 países importaron cosechas de OGM (**Figura 7**).

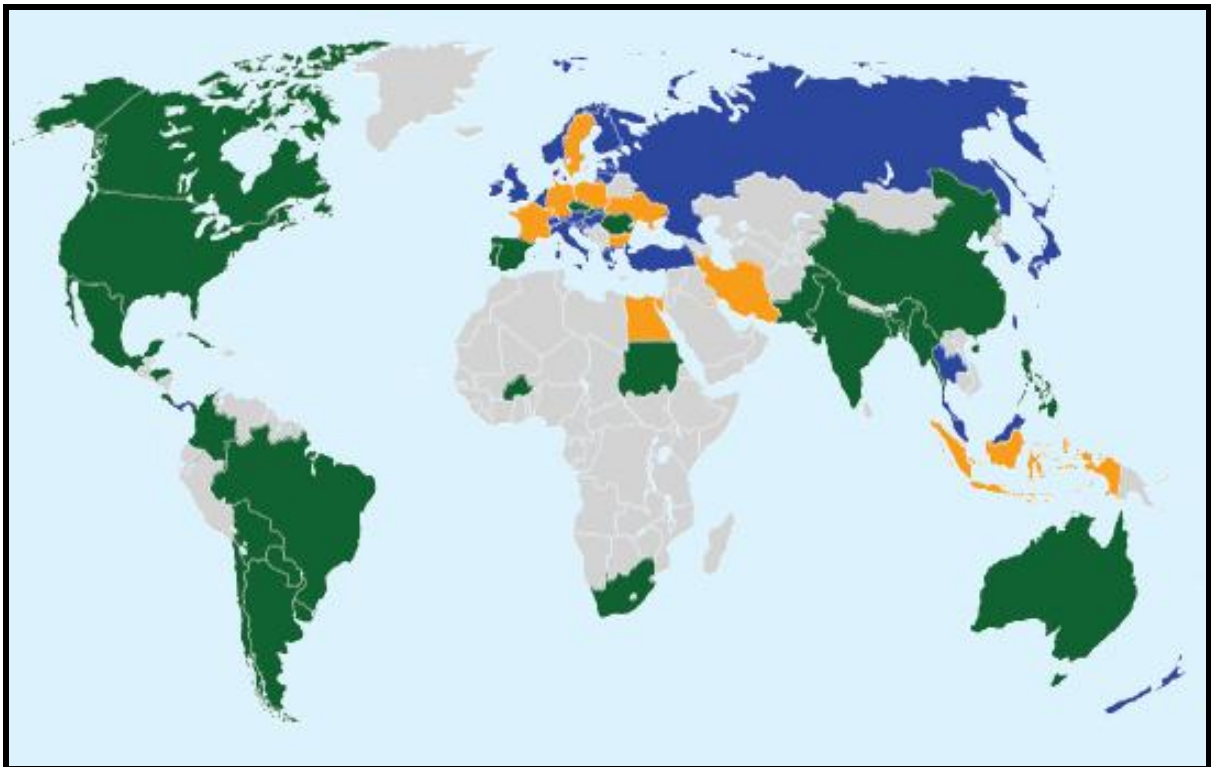


Figura 7. Mapa de adopción de transgénicos. Verde: países que plantan cosechas biotech - Azul: Países que no plantan, pero importan cosechas biotech - Naranja: Países que dejaron de plantar recientemente (Fuente: ISAAA GMO Approval Database)

La Argentina es uno de los países líderes en la utilización en su agricultura de cultivos genéticamente modificados, con más de 22 millones de hectáreas dedicadas a los cultivos de soja (*Glycine max*), maíz (*Zea mays*) y algodón que utilizan este tipo de tecnologías (**Figura 8**). El proceso de adopción de las mismas se inició en el año 1996 con la introducción de la primera soja tolerante al herbicida glifosato y ha continuado ininterrumpidamente, con una dinámica de adopción que ha llevado, a que en la actualidad, este tipo de tecnologías se utilicen en prácticamente la totalidad del cultivo de soja, en el 86% del área de maíz y el 99% de la superficie de algodón. La autorización para la comercialización de un cultivo

transgénico está actualmente a cargo de la Dirección de Biotecnología del Ministerio de Agroindustrias de la Nación. (Fuente: *15 años de cultivos transgénicos en argentina. Eduardo J. Trigo, 2011*)

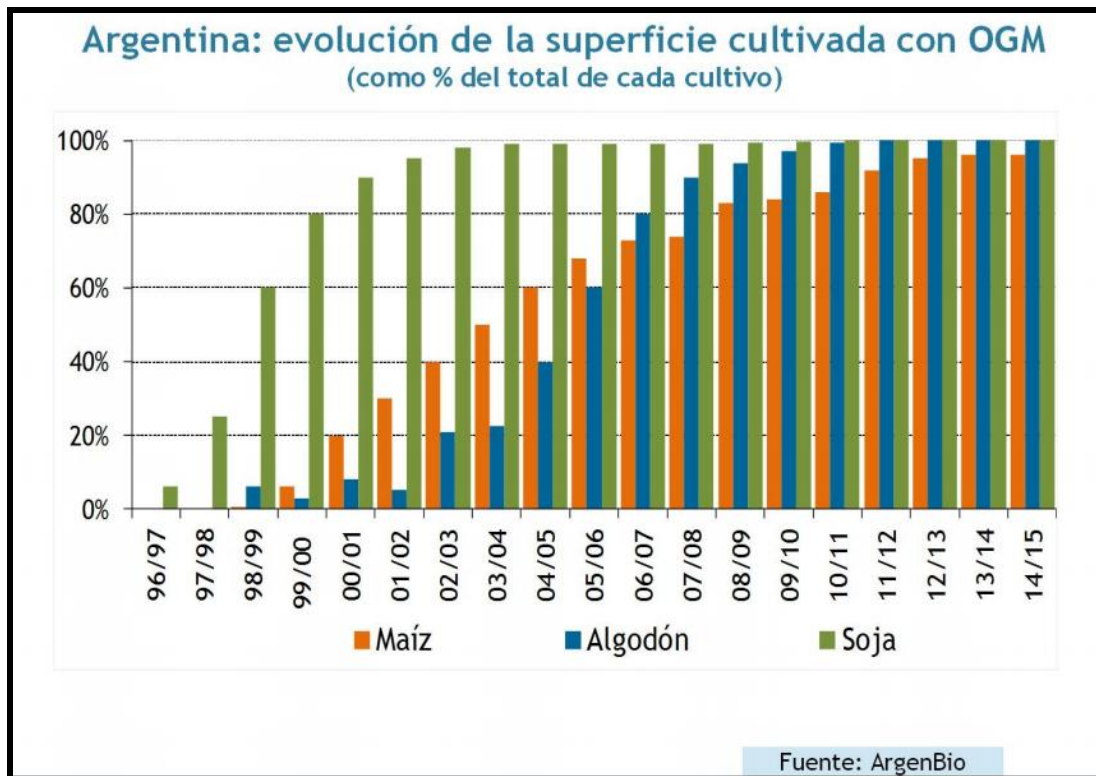


Figura 8. Evolución de la superficie cultivada con OGM en Argentina. El eje horizontal indica tiempo en años, el eje vertical muestra la superficie cultivada como porcentaje. En verde se observa el cultivo de soja, en naranja el de maíz y en azul el de algodón. (Fuente: Argenbio).

Es importante mencionar que el mercado de los productos orgánicos, el cual cuenta con un gran impulso por parte del ministerio de agricultura, excluye a los alimentos modificados genéticamente sin importar su forma de cultivo. Según la **ley nacional 25.127** del año 1999: “*se entiende por ecológico, biológico u orgánico a todo sistema de producción agropecuario, su correspondiente agroindustria, como así también a los sistemas de recolección, captura y caza, sustentables en el tiempo y que mediante al manejo racional de los recursos naturales y evitando el uso de los productos de síntesis química y otros de efecto tóxico real o potencial para la salud humana, brinde productos sanos, mantenga o*

incremente la fertilidad de los suelos y la diversidad biológica, conserve los recursos hídricos y presente o intensifique los ciclos biológicos del suelo para suministrar los nutrientes destinados a la vida vegetal y animal, proporcionando a los sistemas naturales, cultivos vegetales y al ganado condiciones tales que les permitan expresar las características básicas de su comportamiento innato, cubriendo las necesidades fisiológicas y ecológicas". De acuerdo a la coordinación de productos orgánicos del SENASA, se considera a los OGM de riesgo potencial para la salud humana.

1.2 ANTECEDENTES

En contraste con las potenciales ventajas de los organismos genéticamente modificados, se encuentran los riesgos inherentes a las nuevas tecnologías. Por eso se hace necesario evaluar el impacto de los cultivos transgénicos sobre la salud, el efecto en el medio ambiente medio y la biodiversidad. Será de gran importancia, para este trabajo, y para abordar cualquier texto relacionado a OGM, considerar que se tiene que evaluar únicamente la ingeniería genética, y no otras variables como el uso de herbicidas. Si bien es cierto que algunas modificaciones genéticas permiten el uso de agroquímicos, no todos los OGM tienen ese fin ni requieren su uso para mejorar el rinde por hectárea. Por lo que estos deben ser evaluados independientemente de las modificaciones genéticas.

En el año 2014, el estudio *"Prevalence and impacts of genetically engineered feedstuffs on livestock populations"* revisó la performance y la salud de animales alimentados con alimento genéticamente modificado (Van Eenennaam AL, Young AE. 2014). Los resultados no observan diferencias nutricionales entre los perfiles de animales alimentados con OGM. *"Estos conjuntos de datos de campo, lo que representa más de 100 mil millones de animales tras la introducción de los cultivos transgénicos, no revelaron tendencia desfavorable o perturbaciones de la salud y productividad del ganado. Ningún estudio ha revelado ninguna diferencia en el perfil nutricional de los productos derivados de animales alimentados con OGM"*. Además, el trabajo indica que las proteínas y el ADN transgénico debería digerirse de igual forma por el sistema digestivo y que no se detectan trazas de OGM en la leche, carne o huevos de animales que consumieron OGM (Van Eenennaam AL, Young AE. 2014).

En cuanto al cuidado de la biodiversidad, los cultivos transgénicos comercializados actualmente han reducido el impacto de la agricultura. La adopción de prácticas que reducen la necesidad de trabajo labrado en el suelo, la reducción del uso de insecticidas, el uso de más herbicidas ambientalmente benignos y los rendimientos crecientes alivian la presión para convertir la tierra adicional en la agricultura utilizar, como enuncia en el trabajo “*Impact of GM crops on biodiversity*” (Carpenter J.E. 2011). Adicionalmente, en trabajos recientes se concluye que el ADN transgénico no difiere del resto del ADN que forma los alimentos y que la ingesta de este no implica riesgos mayores que la de cualquier otro tipo de ADN. A su vez se indica que hace falta más investigación para confirmar que no hay traspaso de ARN a la microbiota intestinal. En cuanto a las proteínas transgénicas sintetizadas, aun no se encontró evidencia de efectos tóxicos o alergénicos, para los cultivos comerciales en la actualidad (A. Nicola *et al*, 2013).

El impacto ecológico, sobre los insectos que se alimentan de plantas, pero no son el objetivo de las proteínas GM que generan resistencia (*non-target insects*), el impacto sobre la biota del suelo y la persistencia de las proteínas transgénicas en el suelo, fue estudiado por O'Callaghan en el año 2005. En este trabajo no se observan efectos adversos significativos sobre las poblaciones de insectos, la biota y la microflora del suelo, pero remarca el poco conocimiento que se tiene sobre los procesos de descomposición posteriores.

Una aproximación diferente al tema es utilización de simulaciones *in silico* para estudiar posibles efectos de los OGM. Los resultados predicen una acumulación significativa de formaldehído (Ayyadurai, V.A.S. and Deonikar, P., 2015). Los autores sugieren que los organismos reguladores, revisen las normas de seguridad de los OGM, y adopten un enfoque de biología de sistemas utilizando una combinación de *in silico* previo a los experimentos *in vivo*.

También es importante mencionar el trabajo de Seralini del año 2012, “*Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize*”, por la resonancia de sus resultados (el trabajo asociaba tumores en ratas con el consumo de OGM y glifosato). Este trabajo fue ampliamente criticado en la comunidad científica, y retractado por la revista *Food and Chemical Toxicology*, pero el autor se negó a retirarlo. Según la European Food Safety Authority (EFSA) el trabajo era de calidad científica insuficiente para ser considerado como válido para la evaluación de riesgos.

De los trabajos mencionados previamente, ninguno estudia los efectos específicos de los OGM sobre insectos mediante ensayos de laboratorio, y mucho menos sobre *D. melanogaster*. La utilización de *D. melanogaster* como modelo para testear elementos de la dieta ya se la puede encontrar en la bibliografía como en los trabajos “*Dietary restriction in Drosophila*” (Partridge L. *et al*, 2005). “*Dietary composition regulates Drosophila mobility and cardiac physiology*” (Bazzell B. *et al*, 2013), “*Specific Dietary Carbohydrates Differentially Influence the Life Span and Fecundity of Drosophila melanogaster*” (Lushchak OV *et al*, 2014). Incluso en trabajos similares a la investigación propuesta en este trabajo, entre ellos el trabajo “*Organically Grown Food Provides Health Benefits to Drosophila melanogaster*” (Chhabra R. *et al*, 2013). En el mismo se estudian los posibles beneficios de alimentar *Drosophila* con alimentos orgánicos adquiridos directamente de la góndola del supermercado y concluyen: “*Nuestros datos muestran que Drosophila puede ser utilizada como modelo para evaluar experimentalmente potenciales efectos de componentes dietarios en la salud*”.

1.3 MODELO BIOLÓGICO

Los experimentos llevados a cabo en el presente proyecto fueron realizados utilizando el modelo biológico *Drosophila melanogaster* (comúnmente conocida como “*mosca del vinagre*” o “*mosca de la fruta*”). Este insecto presenta un corto ciclo de vida, bajos costos de mantenimiento y altas tasas de reproducción, ventajas que consolidaron su elección como modelo biológico para este proyecto. Gracias a que *D. melanogaster* se alimenta a base de una gran variedad de productos de origen vegetal, fue posible diseñar alimentos para las moscas que satisfagan los requerimientos de este proyecto, incorporando soja y maíz a los medios de cultivo, logrando llevar adelante los experimentos planteados.

Drosophila ha sido utilizada ampliamente como material experimental desde que fue utilizada por W. E. Castle, por primera vez, en 1906. Desde entonces, esta especie se ha convertido en un excelente organismo modelo para la investigación, debido a sus similitudes genéticas con los seres humanos y otros mamíferos. Aproximadamente el 50% de los genes de la mosca son homólogos a los genes de mamíferos. Por otra parte, el 75% de los genes relacionados con enfermedades humanas tienen ortólogos, o genes con funciones similares, en la mosca (JoVE Science Education – An introduction to *Drosophila melanogaster*, 2016). Por

estos motivos la “mosca de la fruta” se ha utilizado de manera productiva, durante más de un siglo, para el estudio de una amplia gama de procesos biológicos como la herencia y su genética asociada, el desarrollo embrionario, el aprendizaje, el comportamiento y el envejecimiento.

Existen muchas ventajas técnicas en la utilización de *Drosophila* respecto a los modelos de vertebrados, estas se relacionan con la facilidad y economía de su mantenimiento, ya que pueden criarse en botellas o viales a los que se les añade un sencillo medio de cultivo. Además, *Drosophila* posee un corto ciclo de vida (15-21 días), y una alta tasa de reproducción (cada mosca hembra puede poner hasta ~ 100 huevos por día), lo cual resulta en la fácil producción de grandes números de progenie para la aplicación de un alto nivel de rigor estadístico en el análisis de los experimentos (Mejía Luis, 2011). Otra ventaja de la mosca del vinagre reside en su gran tamaño, lo que facilita su análisis al microscopio óptico. *Drosophila* puede ser anestesiado de manera segura utilizando dióxido de carbono, ante la necesidad de manipular moscas individuales. (Jennings B., 2011)

El ciclo de vida de la mosca del vinagre se integra en cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. Una vez fecundado, el embrión se desarrolla en el huevo por alrededor de un día (a 25 ° C), antes de la eclosión como una larva. La larva se alimenta y aumenta su tamaño (pasa por tres mudas) durante cinco días hasta que se convierte en pupa y sufre metamorfosis en el adulto a lo largo de cuatro días (**Figura 9**).

Además de la gran cantidad de información que se ha generado con respecto a este organismo, existen en la actualidad una gran cantidad de cepas de laboratorio disponibles para la investigación. Particularmente, los experimentos llevados a cabo en este proyecto fueron realizados con moscas adultas de la línea mutante *yellow white* (*yw*), línea mutante caracterizada por un fenotipo de ojos blancos y cuerpo de color amarillo-claro. Las mutaciones genéticas que generan el citado fenotipo se describen a continuación:

El gen *white*, abreviado *w*, fue descrito por Morgan en 1910, y se ubica en el cromosoma X. Dicho gen está involucrado en la producción y distribución de los pigmentos omocromo (color marrón) y pteridina (color rojo) que se encuentran, entre otros lugares, en los ojos de las moscas adultas. El gen codifica para una proteína transportadora que utiliza la energía generada por la hidrólisis del ATP para transportar sustratos específicos, tales como moléculas de pigmento a los gránulos del ojo. (Marchesano, 2013). En ausencia de *white*, los gránulos no se forman del modo adecuado y la mosca no presenta color de ojos rojo. Al tener

la mutación *w*, las moscas presentan color de ojos blanco, fácilmente identificable. Se trata de una mutación recesiva y ubicada en el cromosoma X.

El gen *yellow*, *y*, está involucrado en la pigmentación melanótica de la cutícula de la mosca adulta y la boca de las larvas. Dicho gen se ubica en el cromosoma X, y el fenotipo de la mutación se manifiesta como una pigmentación alterada (amarilla) en el exoesqueleto del adulto. Se trata de una mutación recesiva que genera un rasgo que podría asemejarse al albinismo.

Como fue mencionado, las moscas utilizadas en los ensayos eran mutantes *yw*, línea por excelencia utilizada como control ya que, a partir de ella se generan la mayoría de las líneas genéticamente modificadas utilizadas para investigación.

CICLO DE VIDA DROSOPHILA

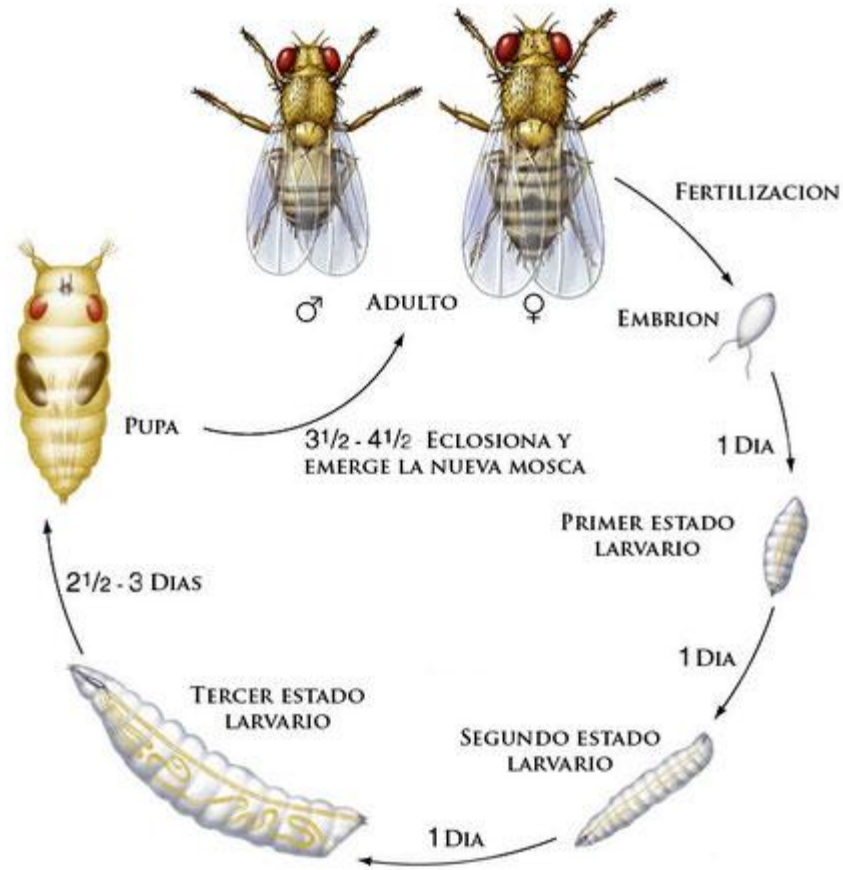


Figura 9. Ciclo de vida *Drosophila melanogaster*. El ciclo de vida de *D. melanogaster* consta de 4 fases bien definidas: huevo, larva, pupa y adulto. El mismo puede variar entre 15 y 21 días según la temperatura. (Fuente: Dentrobates actualidad)

2 OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto consiste en estudiar el efecto de los alimentos genéticamente modificados sobre la expectativa de vida y la fertilidad en el modelo de *Drosophila melanogaster*.

Para este proyecto se propone cumplir los siguientes objetivos específicos:

- 1) Poner a punto la detección molecular de los alimentos transgénicos mediante PCR (diseño de primers, puesta a punto del protocolo y extracción de ADN de los alimentos).
- 2) Determinar si algunos alimentos “orgánicos” seleccionados en este proyecto para ser utilizados como control efectivamente no son transgénicos.
- 3) Desarrollar y formular los medios de cultivo necesarios para el desarrollo de la *Drosophila melanogaster*, a base de maíz y de soja.
- 4) Puesta a punto y desarrollo de los ensayos que permitan medir expectativa de vida y fertilidad en el modelo de *Drosophila melanogaster*.

2.1 RELEVANCIA DEL PROYECTO

Como toda nueva tecnología, la utilización de OGM, actualmente es sometida a diversas investigaciones para garantizar su inocuidad tanto para el consumo como para el medio ambiente. Este trabajo pretende colaborar con la obtención de datos relevantes sobre el efecto de los alimentos genéticamente modificados en el modelo de la mosca del vinagre, y realizar un pequeño aporte al esclarecimiento de la discusión instaurada en la sociedad sobre los alimentos GM.

A su vez, para la investigación de este proyecto final se incorporará nuevo material biológico, equipos y técnicas para el manejo de moscas que serán de gran utilidad para el uso en docencia y en futuras investigaciones desarrolladas en el contexto de los UADE Labs.

En cuanto a las técnicas de biología molecular, se pondrán a punto técnicas de

extracción de ADN vegetal y de PCR que no requieran el uso de kits, por lo que una vez puestas a punto dentro del laboratorio, se mantendrán los protocolos estandarizados y quedarán a disposición de docentes y alumnos del área de BIOciencias de la Fundación UADE.

3 HIPÓTESIS

El consumo de alimentos genéticamente modificados no genera diferencias en la productividad, expectativa de vida y resistencia al *starving* (hambre) en el modelo *Drosophila melanogaster*.

4 MATERIALES Y METODOS

Con el fin de corroborar la presencia de la modificación genética en los granos a utilizar para los ensayos se realizó una PCR. Previo a los ensayos sobre las muestras de granos, se procedió a evaluar todos los reactivos y termocicladoras disponibles en el laboratorio, mediante una serie de reacciones de PCR (resultados en el **Anexo II**). Una vez que se confirmó el buen estado de los recursos del laboratorio se procedió con los ensayos relevantes para este trabajo.

4.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Con el fin de obtener ADN purificado, apto para realizar PCR, se utilizó el método del bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) (Murray y Thompson, 1980), útil para ADN de vegetales y alimentos derivados de vegetales y especialmente indicado para eliminar fenoles que afectaría ensayos subsiguientes. El protocolo es el indicado por manual del “Curso de formación sobre Análisis de la presencia de organismo genéticamente modificados en muestras de alimentos” (Querci M. *et al*, 2007).

Materiales:

- Calentador
- Centrífuga
- Micropipetas
- Vortex
- Tubos de micentrífuga de 1.5ml
- Balanza

Reactivos:

- Bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB)
- Cloroformo

- Isopropanol
- Na₂EDTA
- Etanol
- Proteinasa K
- NaCl
- Ribonucleasa A
- Tris-HCl
- Agua desionizada esterilizada

Soluciones

- Buffer CTAB: CTAB 20g/l ; NaCl 1.4M ; Tris-HCl 0,1M ; Na₂EDTA 20mM. pH ajustado a 8,0 con NaOH 1M. Autoclavado y conservado a 4°C
- Solución de Precipitación CTAB: CTAB 5g/l ; NaCl 0.04M. pH ajustado a 8,0 con NaOH 1M. Autoclavado y conservado a 4°C
- NaCl 1,2 M. Autoclavado y conservado a temperatura ambiente

Procedimiento

- Depositar 100 mg de muestra homogénea en un tubo estéril de 1,5 ml para microcentrífuga;
- Añadir 300 µl de agua desionizada estéril y mezclar con un asa;
- Añadir 500 µl de buffer a base de CTAB y mezclar con un asa;
- Añadir 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml), agitar e incubar a 65°C durante 60 minutos
- Añadir 20 µl de ribonucleasa A (10 GM/ml), agitar e incubar a 65°C durante 10 minutos
- Centrifugar durante 10 minutos a 13.4 rpm
- Trasladar el sobrenadante a un tubo de microcentrifugación que contenga 500 µl de cloroformo y agitar durante 30 segundos
- Centrifugar durante 15 minutos a 13.4 rpm hasta que se separen las fases;
- Trasladar 500 µl de la capa superior a otro tubo de microcentrifugación que contenga 500 µl de cloroformo y agitar;
- Centrifugar durante 5 minutos a 13.4 rpm

- Trasladar la capa superior a otro tubo de microcentrifugación;
- Añadir 2 volúmenes de solución de precipitación a base de CTAB y mezclar pipeteando;
- Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente;
- Centrifugar durante 5 minutos a 13.4 rpm
- Desechar el sobrenadante;
- Disolver el precipitado en 350 µl NaCl (1,2 M);
- Añadir 350 µl de cloroformo y agitar durante 30 segundos;
- Centrifugar durante 10 minutos a 13.4 rpm hasta que se separen las fases;
- Trasladar la capa superior a otro tubo de microcentrifugación;
- Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol y agitar, incubar en freezer a -20°C overnight
- Centrifugar durante 10 minutos a 13.4 rpm;
- Desechar el sobrenadante;
- Añadir 500 µl de solución de etanol al 70 % y agitar con cuidado;
- Centrifugar durante 10 minutos a 13.4 rpm;
- Desechar el sobrenadante;
- Secar los sedimentos y volver a disolver el ADN en 100 µl de agua desionizada estéril.
- La solución se almacena a -20°C

4.2 PCR

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por K. Mullis y sus colaboradores en 1985, ha revolucionado la biología molecular y la medicina molecular (Saiki *et al.*, 1985). La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. Mientras que antes solo podían obtenerse cantidades mínimas de un gen específico, ahora incluso un único ejemplar de un gen puede amplificarse con la PCR hasta un millón de ejemplares en tan solo unas pocas horas.

Las técnicas de PCR se han hecho indispensables para muchos procedimientos comunes, como la clonación de fragmentos específicos de ADN, la detección e identificación de genes para diagnóstico y medicina legal, y en la investigación de modelos de expresión de los genes. Más recientemente, la PCR ha permitido la investigación de nuevos campos, como

el control de la autenticidad de los alimentos, la presencia de ADN modificado genéticamente y la contaminación microbiológica.

Los protocolos siguientes son métodos basados en la PCR que permiten la detección OGM (mediante el promotor 35S) en material bruto y transformado por comparación con muestras correspondientes no modificadas genéticamente (soja y maíz).

A continuación se describen los materiales y reactivos necesarios para la realización de todas las PCRs:

Instrumental

- Micropipetas
- Termociclador
- Microcentrífuga
- Vortex
- Soporte para tubos de reacción
- Tubos de reacción para PCR de 0,2 ml
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 ml

Reactivos

- dATP
- dCTP
- dGTP
- dTTP
- Buffer de PCR concentrado 10 veces
- MgCl₂ 25 mM
- ADN polimerasa *Taq*
- Oligonucleótidos de uso anterior y posterior
- Agua libre de nucleasa

4.2.1 PCR ESPECÍFICA DE PLANTAS: GEN DE LA LECITINA DE SOJA

Para la identificación del ADN de la soja, se utilizaron los primers **GMO3** y **GMO4** (Meyer *et al.*, 1996), que amplifican un fragmento del gen de la lecitina (*Le1*), específico de la

soja, su secuencia y características se describen en la **Tabla 1**.

El objetivo es confirmar la presencia y la calidad del ADN extraído de las muestras de soja, entendiéndose aquí por calidad del ADN su capacidad de amplificación por la PCR. El producto previsto es un amplicón de **118 pb**.

Tabla 1. Características de los primers GMO3y GMO4

GMO3	
Secuencia	GCCCTCTACTCCACCCCATCC
Longitud	22
Peso molecular (g/mol)	6471,6
Punto de fusión * (G/C)	65,1
GMO4	
Secuencia	GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG
Longitud	23
Peso molecular (g/mol)	6981,1
Punto de fusión * (G/C)	59,6

*Suponiendo que la [Na⁺] sea de 50 mM.

El protocolo para la PCR en la detección de lecitina se describe a continuación:

Tabla 2. Mastermix GMO3-GMO4

	Concentración final	Mezcla maestra para una muestra	Mezcla maestra para 10 muestras
Agua desionizada esterilizada		32,75 µl	327,5 µl
Tampón para PCR 10x	1x	5 µl	50 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM	5 µl	50 µl
dNTP 4 mM	0,2 mM	2,5 µl	25 µl
Oligonucleótido GMO3 20 µM	0,5 µM	1,25 µl	12,5 µl
Oligonucleótido GMO4 20 µM	0,5 µM	1,25 µl	12,5 µl
ADN polimerasa <i>Taq</i>	0,025 U/µl	0,25 µl	2,5 µl
TOTAL		48 µl	480 µl

Preparación de la mezcla maestra

- Preparar un tubo para microcentrífuga de 1,5 ml
- Añadir los reactivos siguiendo el orden indicado en la **Tabla 2**
- Agitar suavemente la mezcla maestra de GMO3 y GMO4 por pipeteado y centrifugar brevemente.
- Dividir la mezcla maestra en alícuotas de 48 µl en tubos de reacción de PCR de 0,2 ml
- Añadir 2 µl de la solución de ADN a dichas alícuotas
- Agitar suavemente y centrifugar brevemente
- Colocar los tubos de reacción de PCR en el termociclador, ver programa de ciclado en **Tabla 3.**

Tabla 3. Programa PCR GMO3/GMO4

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min
Desnaturalización	95 °C	30 s
Anillamiento	63 °C	30 s
Extensión	72 °C	30 s
Número de ciclos	40	
Extensión final	72 °C	3 min
	4 °C	∞

Controles

Al realizar análisis con PCR deben incluirse los siguientes controles:

- Control positivo: ADN puro, aislado de la soja convencional
- Control negativo: control negativo de la mezcla maestra, utilizando agua en vez de ADN.

Análisis de los productos de la PCR

Tras la amplificación de la secuencia diana, se analizan los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio. Se mezclan 8 µl

de una reacción de PCR con 2 µl de tampón de carga, tras lo cual se cargan las muestras en el gel de agarosa (1,5 %). Se realiza una migración a 100 V durante 1 hora. Se someten a electroforesis marcadores de tamaño (15 µl de una escalera de 100 pb) en pocillos adyacentes del gel, de forma que pueda determinarse con precisión el tamaño de los amplicones. Completado el ciclo, el ADN del gel puede visualizarse mediante transiluminación ultravioleta. Para llevar un registro fiel del resultado del ensayo, puede fotografiarse el gel.

4.2.2 PCR ESPECÍFICA DE PLANTAS: GEN DE LA ZEÍNA DE MAÍZ

Los cebadores **ZEIN3** y **ZEIN4** (Studer *et al.*, 1997) específicos del gen de la zeína en el caso del maíz (*Ze1*, codificación de una proteína de 10 kb) se utilizan para confirmar la presencia y la calidad del ADN extraído de muestras que contienen maíz (ver **Tabla 4**). Si el ADN diana extraído está presente, intacto y es amplificable, se prevé la amplificación de una banda de **329 pb**.

Tabla 4. Características de los primers ZEIN3 y ZEIN 4

ZEIN3	
Secuencia	AGTGC GACCCATATTCCAG
Longitud	19
Peso molecular (g/mol)	5772,3
Punto de fusión * (G/C)	55,2
ZEIN4	
Secuencia	GACATTGTGGCATCATCATT
Longitud	21
Peso molecular (g/mol)	6410,9
Punto de fusión * (G/C)	51,7

*Suponiendo que la [Na⁺] sea de 50 mM.

Tabla 5. Mastermix ZEIN3/ZEIN4

	Concentración final	Mezcla maestra para una muestra	Mezcla maestra para 10 muestras
Agua desionizada esterilizada		32,75 µl	327,5 µl
Tampón de PCR 10x	1x	5 µl	50 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM	5 µl	50 µl
dNTP 4 mM	0,2 mM	2,5 µl	25 µl
Oligonucleótido ZEIN3 20 µM	0,5 µM	1,25 µl	12,5 µl
Oligonucleótido ZEIN4 20 µM	0,5 µM	1,25 µl	12,5 µl
ADN polimerasa <i>Taq</i>	0,025 U/µl	0,25 µl	2,5 µl
TOTAL		48 µl	480 µl

Preparación de la mezcla maestra

- Preparar un tubo para microcentrifuga de 1,5 ml
- Añadir los reactivos siguiendo el orden indicado la **Tabla 5**.
- Agitar suavemente la mezcla maestra de ZEIN3 y ZEIN4 por pipeteado y centrifugar brevemente
 - Dividir la mezcla maestra en alícuotas de 48 µl en tubos de reacción de PCR de 0,2 ml
 - Añadir 2 µl de la solución de ADN a dichas alícuotas
 - Agitar suavemente y centrifugar brevemente
 - Colocar los tubos de reacción de PCR en el termociclador, ver programa de ciclado en **Tabla 6**.

Tabla 6. Programa PCR (ZEIN3/ZEIN4)

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min
Desnaturalización	96 °C	1 min
Anillamiento/Extensión	60 °C	1 min
Número de ciclos	40	
Extensión final	72 °C	3 min
	4 °C	∞

Controles

Al realizar análisis con PCR deben incluirse los siguientes controles:

- Control positivo: ADN puro, aislado de maíz convencional
- Control negativo: control negativo de la mezcla maestra, utilizando agua en vez de ADN.

Análisis de los productos de la PCR

Tras la amplificación del ADN, se analizan los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio. Se mezclan 8 µl de la solución con 2 µl de tampón de carga, tras lo cual se carga la mezcla en el gel de agarosa (1,5 %). Se realiza una migración a 100 V durante 1 hora. Se someten a electroforesis marcadores de tamaño (15 µl de una escalera de 100 pb) en pocillos adyacentes del gel, de forma que pueda determinarse con precisión el tamaño de los amplicones. Completado el ciclo, el ADN del gel puede visualizarse mediante transiluminación ultravioleta. Para llevar un registro fiel del resultado del ensayo, puede fotografiarse el gel.

4.2.3 DETECCIÓN DEL PROMOTOR CaMV 35S MEDIANTE PCR

Los genes están sometidos a la regulación de promotores y terminadores. Las secuencias más utilizadas para la regulación de un transgén son el promotor 35S (derivado del virus del mosaico de la coliflor) y el terminador *nos* (derivado de *Agrobacterium tumefaciens*). La

detección de una de estas secuencias reguladoras en una muestra con soja o maíz indica la presencia de OGM. En la soja *Roundup Ready*, pueden detectarse tanto el promotor 35S como el terminador *nos*, mientras que en las líneas de maíz Bt-176 y MON810 sólo se da la presencia del promotor 35S.

Para la confirmación de la presencia de OGM, se realizó en este proyecto un ensayo de PCR para la detección del promotor 35S, las secuencias de los cebadores utilizados en dicho ensayo se describen en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Características de los cebadores p35S-cf3 y p35S-cr4

p35S-cf3	
Secuencia	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG
Longitud	21
Peso molecular (g/mol)	6414,5
Punto de fusión * (G/C)	57,4
p35S-cr4	
Secuencia	TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC
Longitud	25
Peso molecular (g/mol)	7544,2
Punto de fusión * (G/C)	56,3

*Suponiendo que la [Na+] sea de 50 mM.

El protocolo para la PCR en la detección del promotor 35S se describe a continuación:

Tabla 8. Mezcla maestra de p35S-cf3 y p35S-cr4

	Concentración final	Mezcla maestra para una muestra	Mezcla maestra para 10 muestras
Agua desionizada esterilizada		32,75 µl	327,5 µl
Tampón para PCR 10x	1x	5 µl	50 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,5 mM	5 µl	50 µl
dNTP 4 mM	0,2 mM	2,5 µl	25 µl
Oligonucleótido p35S-cf3 20 µM	0,5 µM	1,25 µl	12,5 µl
Oligonucleótido p35S-cr4 20 µM	0,5 µM	1,25 µl	12,5 µl
ADN polimerasa <i>Taq</i>	0,025 U/µl	0,25 µl	2,5 µl
TOTAL		48 µl	480 µl

Preparación de la mezcla maestra

- Preparar un tubo para microcentrifuga de 1,5 ml
- Añadir los reactivos siguiendo el orden indicado en la **Tabla 8**.
- Agitar suavemente la mezcla maestra de p35S-cf3 y p35S-cr4 por pipeteado y centrifugar brevemente.
- Dividir la mezcla maestra en alícuotas de 48 µl en tubos de reacción de PCR de 0,2 ml
- Añadir 2 µl de la solución de ADN a dichas alícuotas
- Agitar suavemente y centrifugar brevemente
- Colocar los tubos de reacción de PCR en el termociclador, ver programa de ciclado en **Tabla 9**.

Tabla 9. Programa PCR (p35S-cf3 y p35S-cr4)

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min
Desnaturalización	95 °C	25 s
Anillamiento	62 °C	30 s
Extensión	72 °C	45 s
Número de ciclos	50	
Extensión final	72 °C	7 min
	4 °C	∞

Controles

- Control positivo: ADN del material de referencia
- Control negativo: control negativo de la mezcla maestra, utilizando agua en vez de ADN.

Análisis de los productos de la PCR

Tras la amplificación, se analizan los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio. Se mezclan 8 µl de la solución con 2 µl de tampón de carga, tras lo cual se carga la solución en el gel de agarosa (2,5 %). Se realiza una migración a 100 V durante 1 hora. Se someten a electroforesis marcadores de tamaño (15 µl de una escalera de 100 pb) en pocillos adyacentes del gel, de forma que pueda determinarse con precisión el tamaño de los amplicones. Completado el ciclo, el ADN del gel puede visualizarse mediante transiluminación ultravioleta. Para llevar un registro fiel del resultado del ensayo, puede fotografiarse el gel.

4.3 TRABAJO CON EL MODELO BIOLÓGICO

Los ensayos de productividad, supervivencia y *starving* fueron llevados a cabo en el Flyroom, espacio creado especialmente para el trabajo con *Drosophila melanogaster*, ubicado en el noveno piso de los UADE Labs. Este laboratorio se encuentra apropiadamente equipado y cuenta con un hall pre-laboratorio, delimitado por una doble puerta diseñada con el fin de evitar el escape de individuos experimentales. El equipamiento utilizado durante este proyecto para el manejo y mantenimiento de moscas consta principalmente de: incubadora (SPX – 150B Bioincubator –Taisitie), lupas estereoscópicas (Stemi 2000 Zeiss), dispositivo de suministro de CO₂ y camas acopladas (Geneesee Scientific), (**Figura 10**)



Figura 10. Equipamiento disponible en el Flyroom. (A) Dispositivo de suministro de CO₂. (B) Lupa estereoscópica con camas acopladas. (C y D) Incubadora.

La línea de moscas *Yellow White* (*yw* - mutantes de cuerpo amarillo y ojos blancos), utilizada para la realización de los ensayos, fue cedida gentilmente por el laboratorio del Dr. Pablo Wappner del Instituto Leloir. Además de *yw* (**Figura 11**), también fueron cedidas otras líneas de *Drosophila*, actualmente utilizadas para docencia e investigación en los UADE Labs.



Figura 11. *Drosophila melanogaster*, Yellow White. Línea mutante de *D. melanogaster* (con cuerpo amarillo y ojos blancos), utilizada en los experimentos. (Fuente: Scientific American)

Todos las líneas de *Drosophila* presentes en los UADE Labs son mantenidas en incubadora con humedad y temperatura controlada (18 a 25°C) en viales conteniendo medio de cultivo estándar, el cual se elabora en base al protocolo cedido por el Instituto Leloir, y consta básicamente de: agua, sacarosa, levadura, agar, nipagin, ácido propiónico y harina de maíz (**Anexo III**).

4.4 OGM Y MEDIOS DE CULTIVO

Los ensayos propuestos en el presente trabajo, fueron planteados, inicialmente, para realizarse utilizando granos de soja y maíz. Con el fin de obtener los granos transgénicos se recurrió a una empresa de acopio de cereales, la cual donó los granos de soja (Nidera 4990 RG) con resistencia a glifosato (RG) para la experimentación. En contraste, se presentó una

gran dificultad a la hora de obtener maíz que sólo presentara la modificación genética que le otorga resistencia al glifosato, debido a que la gran mayoría de las cepas de maíz que existen actualmente en el mercado son Bt, es decir, que posean en su genoma la secuencia que codifica para proteínas insecticidas (motivo por el cual no era posible su utilización en los experimentos). Luego de una extensa búsqueda, se lograron obtener granos RG y semillas RG de maíz. Los granos de maíz RG (sin Bt) provenían de una siembra en la que se había utilizado glifosato (variable no considerada en este proyecto), por lo que se rechazó su uso en los experimentos. Por este motivo se decidió sembrar las semillas de maíz (LT 622 RR2, híbrido tolerante a Glifosato), que cumplían con las características requeridas para este trabajo, evitando la utilización de glifosato o de insecticidas, con el fin de obtener granos de maíz RG, libres de cualquier contaminante (**Figura 12**). Se sembraron decenas de semillas, de las cuales sólo se obtuvo una planta de maíz (**Figura 13**). La cantidad de granos obtenidos de dicha siembra no fue suficiente para cubrir las necesidades de los experimentos, y considerando el tiempo que conllevaría una nueva siembra se decidió llevar a cabo los experimentos únicamente con soja.

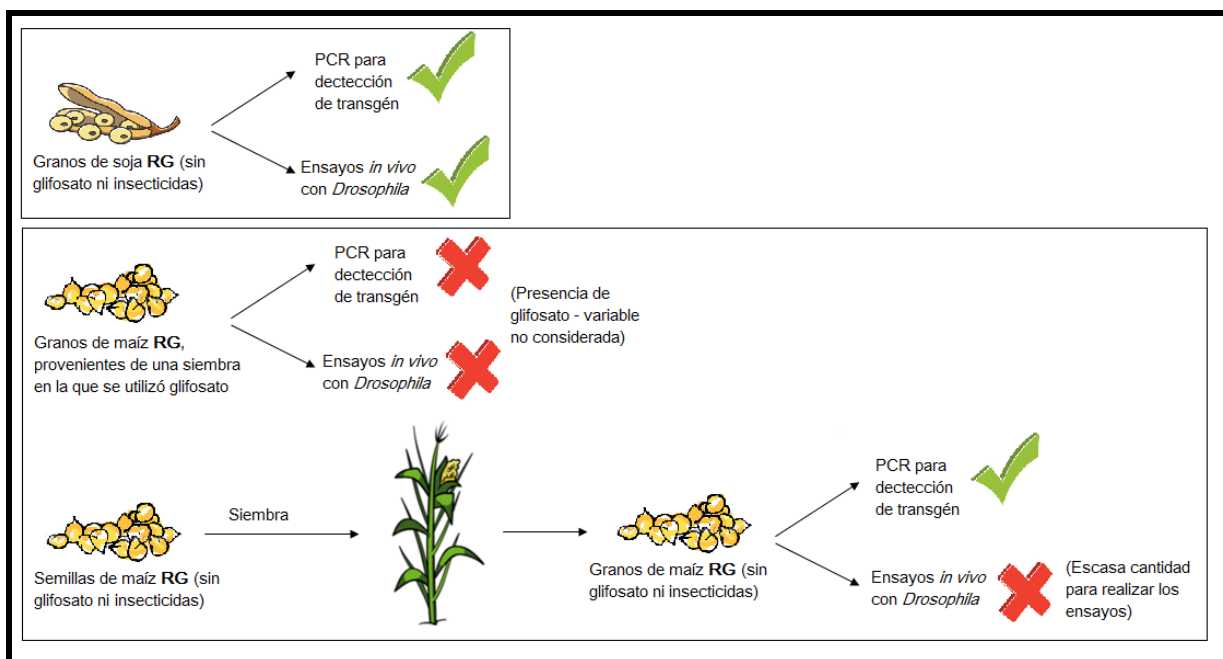


Figura 12. Muestras utilizadas en ensayos y PCR. Esquema de obtención y utilización de maíz y soja en los ensayos in vivo y PCR.



Figura 13. Maíz sembrado para experimentación. Planta de maíz obtenida de la siembra de semillas de maíz LT 622 RR2, (con resistencia al glifosato). Abajo a la derecha: mazorca de maíz obtenida de la cosecha. La cantidad de granos obtenidos fue escasa, no se logró conseguir la cantidad requerida para los experimentos.

La soja orgánica (certificada “libre de transgénicos”) fue adquirida en una tienda de productos orgánicos (**Figura 14**). La ausencia del transgén en los granos de soja fue corroborada mediante PCR, dichos ensayos fueron detallados en la **sección 4.2.3**.



Figura 14. Soja Orgánica. Izquierda: Soja orgánica certificada “libre de transgénicos”, utilizada como control en los ensayos con *D. melanogaster*. Derecha: local “La esquina de las flores”, fuente de productos “orgánicos” en el mercado local. (Fuente: www.laesquinadelasflores.com)

Para a la elaboración de los medios de cultivos utilizados en los ensayos, fue necesario adaptar de protocolo estándar con el objetivo de realizar el alimento a partir de granos de soja. Con ese fin, la soja cruda fue procesada y luego sometida al método de cocción tradicional en reemplazo de la harina de maíz, probando distintos tiempos de cocción hasta encontrar el óptimo.

Una vez logrados los medios de cultivo específicos, fue necesario obtener moscas adultas sincronizadas, ya que resulta imprescindible utilizar en los ensayos moscas de la misma edad con el fin de evitar desvíos generados por distintos estadios madurativos que conduzcan a resultados erróneos.

La sincronización consiste en dejar que las moscas parentales pongan huevos durante una cantidad de tiempo determinada, obteniendo así moscas adultas de la misma edad (**Figura 15**). La sincronización comenzó con un pool de moscas, realizado a partir de varios viales que contenían yw en medio estándar (el objetivo es minimizar las diferencias que pudieran existir entre cada uno de los viales, y obtener un grupo de moscas homogéneo). A continuación se distribuyeron las moscas del pool aleatoriamente en 20 viales conteniendo los

medios específicos para los ensayos (10 Soja RG y 10 Control.), cada vial finalmente contenía una cantidad aproximada de entre 80 a 100 moscas. Estos viales fueron colocados en la incubadora durante 6 horas, retirando las moscas pasado este tiempo. Los huevos colocados durante ese período dieron lugar a los adultos sincronizados (F1), que comenzaron a emerger luego del día 12. Las moscas obtenidas de la sincronización fueron utilizadas en los ensayos que se describen en la **sección 5.2**.

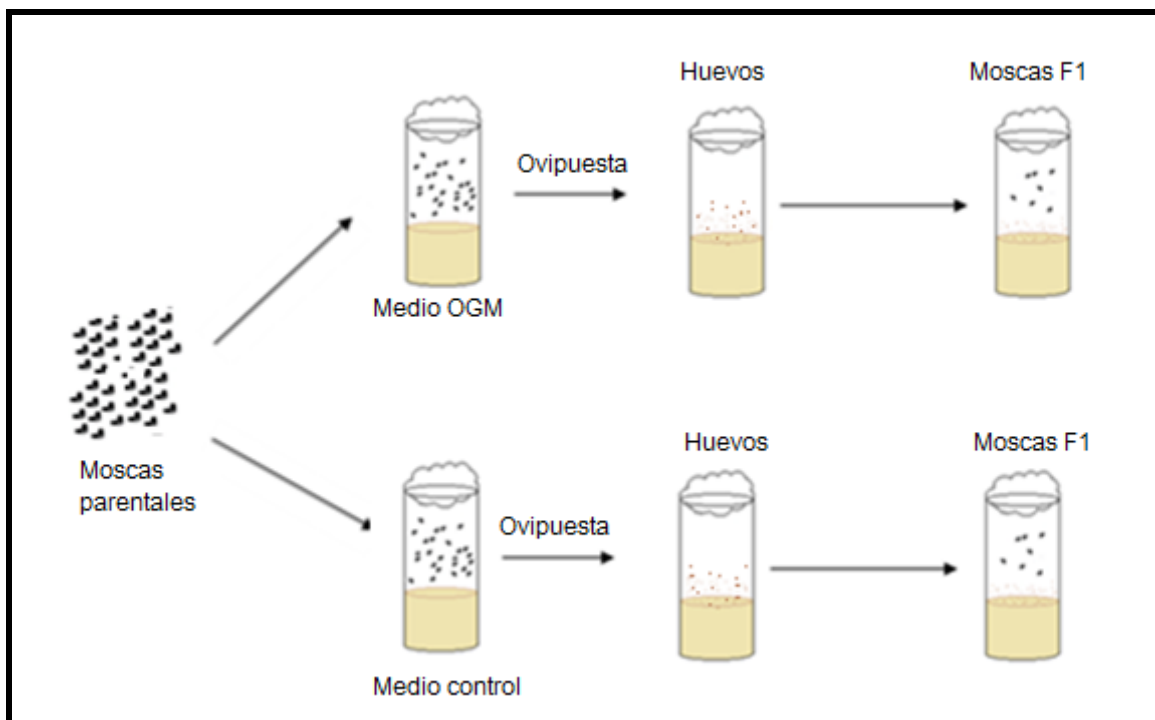


Figura 15. Esquema de metodología de obtención de moscas sincronizadas. La sincronización comienza con la ovipuesta de las moscas parentales, en los medios OGM y control, durante un tiempo determinado. Las moscas son retiradas de los viales. Los huevos colocados darán lugar a los adultos (F1), los cuales se utilizan en los ensayos.

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICACIÓN DE OGM

Para la identificación de cultivos genéticamente modificados se trabajó con el ADN extraído de los granos (**Figura 16**) Se utilizó la detección por la técnica de PCR, para detectar el promotor P-CaMV E35S (**Figura 17**), fuerte promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor, de secuencia conocida, altamente estudiado, y presente en todos los cultivos genéticamente modificados permitidos en Argentina. Como controles internos se utilizó el gen de la lecitina para la soja, y el gen de la proteína zein para el maíz.

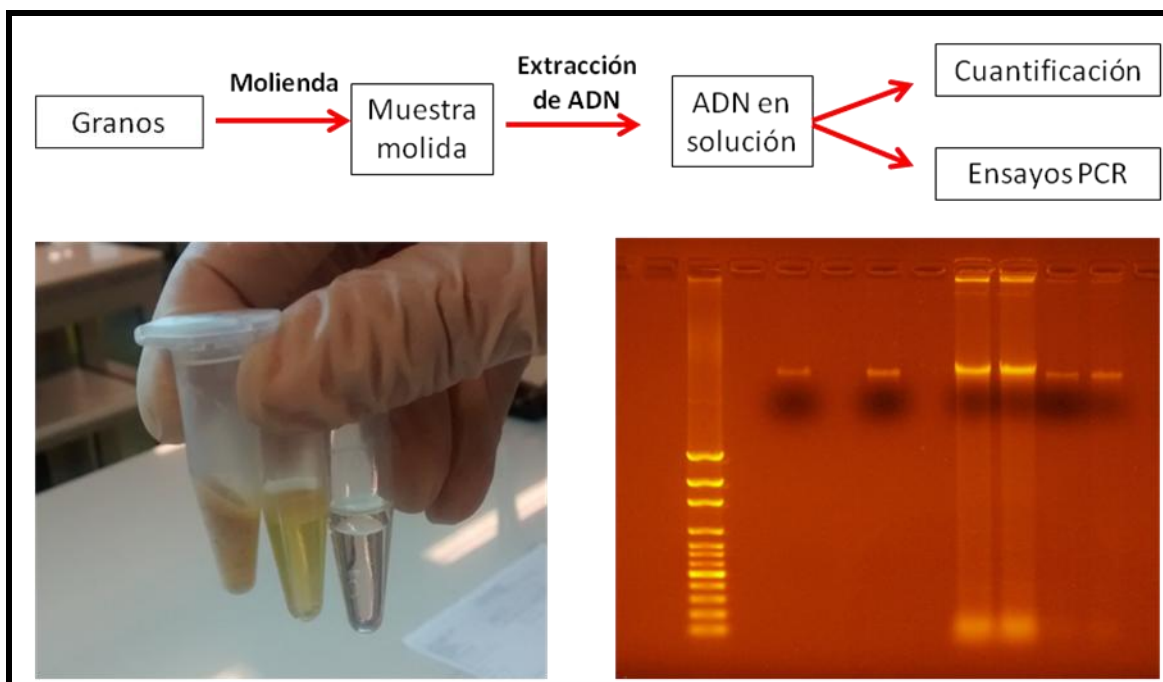


Figura 16. Detalles de la extracción de ADN. a) Esquema de los pasos para la extracción de ADN y su posterior análisis por PCR. b) Tubos de 1,5ml en los que se puede observar la evolución en la purificación del ADN. c) Siembras de ADN genómico en gel de agarosa para cuantificar y descartar contaminación con ARN.

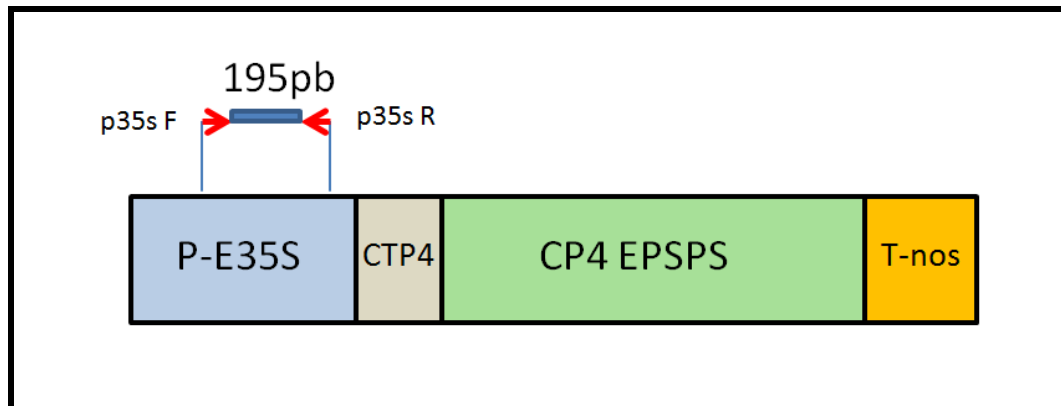


Figura 17. Representación esquemática de la resistencia al glifosato y la posición relativa de los primers. El casete del gen consistente en el promotor E35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), un péptido de tránsito del cloroplasto, la secuencia de codificación CP4 EPSPS y la secuencia de poliadenilación “nos”.

5.1.1 PCR DE MAÍZ

El ADN obtenido de las extracciones de maíz se utilizó en las PCR. Inicialmente se evaluó el control interno, zein. Como se ve en la **Figura 18** se observó la presencia de una banda del tamaño esperado (329pb) para dicho gen en todas las muestras: control positivo (ADN de maíz cedido por el laboratorio de biotecnología del INTA), maíz GM y maíz no GM. En el control negativo se utilizó agua en vez de ADN. Con estos resultados se concluyó que el ADN genómico obtenido estaba en condiciones para la técnica de PCR.

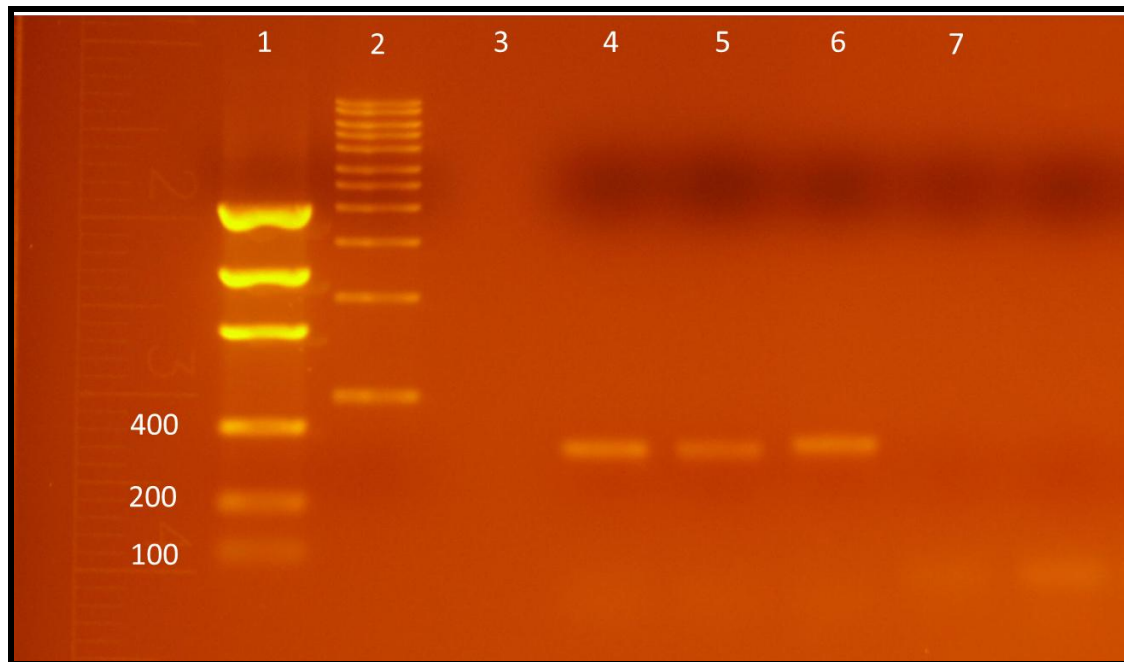


Figura 18. PCR – Zein, control interno de maíz. Gel de agarosa con siembra de PCR para Zein. Se describe la siembra en cada calle: 1: Low Mass Ladder, 2: 1Kb Ladder, 4: Control positivo, 5: Maíz GM, 6: Maíz no GM, 7: Control negativo

Posteriormente se evaluó la presencia del transgén, mediante la PCR para el promotor constitutivo de dicho transgén (P-CaMV E35S). En la **Figura 19** se muestra una banda del tamaño esperado (195pb) únicamente en las muestras de maíz modificado genéticamente. Se utilizó como templado el ADN obtenido de la extracción en iguales concentraciones, y una dilución al medio de cada uno. Se verificó que el maíz genéticamente modificado, efectivamente cuenta con el promotor transgénico. De igual manera se pudo observar que las muestras orgánicas contienen trazas del transgén. Concluyendo que la cantidad de transgen en el maíz GM es considerablemente mayor que en el maíz control.

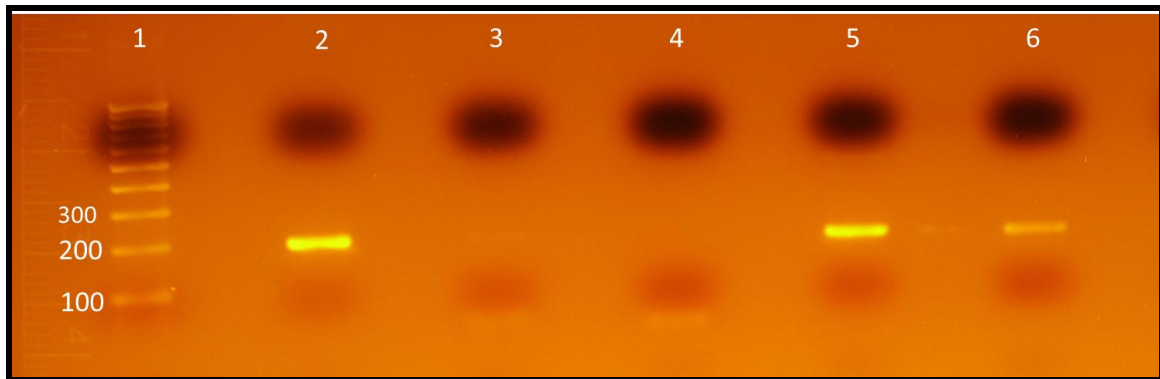


Figura 19. PCR para el promotor CaMV en maíz. Gel de agarosa con siembra de PCR para CaMV E35S. Se describe la siembra en cada calle: 1: 100bp ladder, 2: Control positivo, 3: Maíz no GM, 4: Maíz no GM (dilución ½), 5: Maíz GM, 6: Maíz GM (dilución ½).

Se realizó una nueva corrida mezclando los resultados, para comparar los tamaños (**Figura 20**), logrando diferenciar claramente el amplicón obtenido para zein del amplicón obtenido para el promotor transgénico.

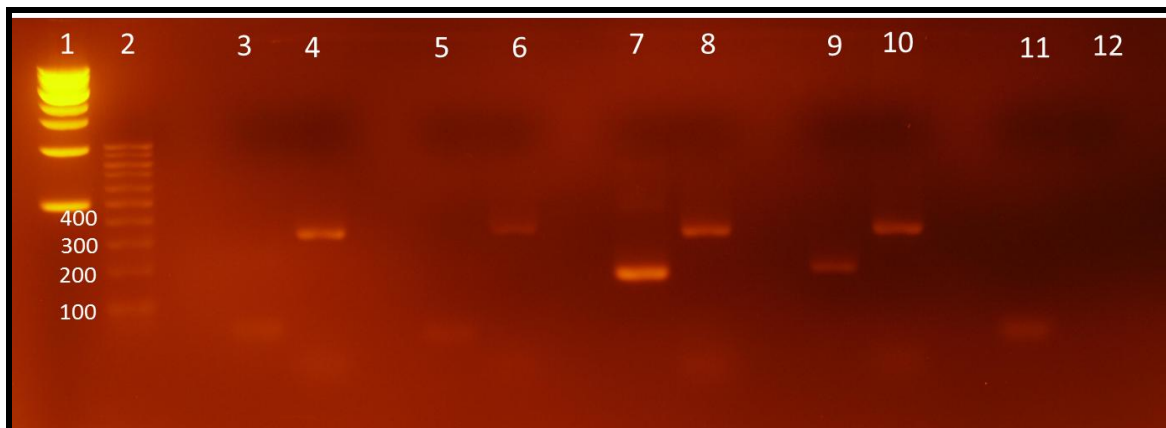


Figura 20. PCR - siembra de Zein y CaMV en muestras de maíz. Orden de siembra en calles: 1: 1kb ladder, 2: 100 bp ladder, 3: Maíz no GM/transgen, 4: Maíz no GM/zein, 5: Maíz no GM/transgen (dilución ½), 6: Maíz no GM/zein (dilución ½), 7: Maíz GM/transgén, 8: Maíz GM/zein, 9: Maíz GM/transgén (dilución ½), 10: Maíz GM/zein (dilución ½), 11: Control negativo/zein, 12: Control negativo/transgen.

5.1.2 PCR DE SOJA

Para la identificación del transgén se utilizó el mismo target que en maíz, mientras que el control interno fue el gen de la lecitina de soja, que dio un amplicón de 118 pb (**Figura 21**). Se utilizaron tanto la concentración obtenida de la extracción, como diluciones al medio. En todos los controles negativos se utilizó agua en vez de ADN.

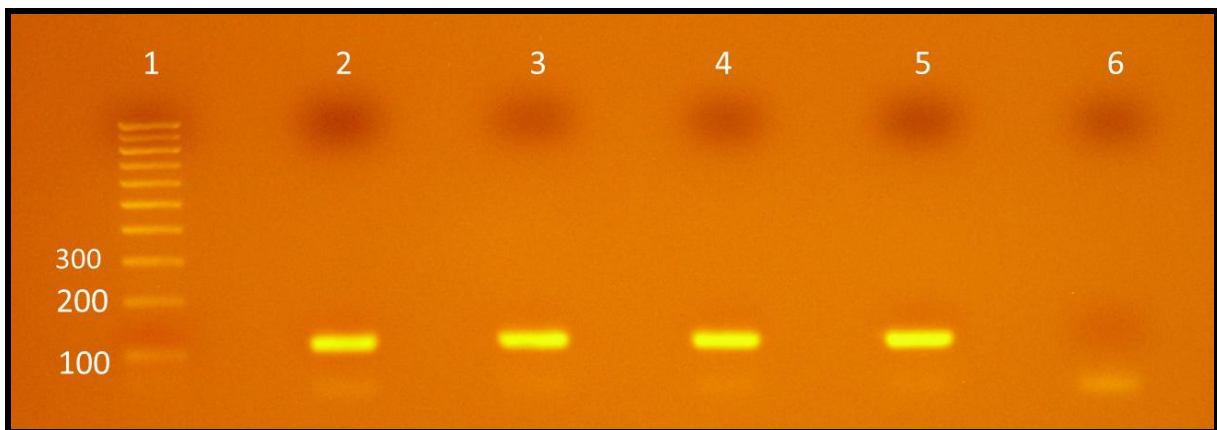


Figura 21. PCR en diferentes muestras de soja, para el gen de Lecitina (control interno). Orden de siembra de calles: 1: 100bp ladder, 2: Soja GM, 3: Soja GM (dilución ½), 4: Soja no GM, 5: Soja no GM (dilución ½), 6: Control negativo

En la amplificación del transgén se observó la presencia de este en la soja GM y una muy pequeña banda del mismo amplicón en las muestras orgánicas, persistente en diferentes siembras, adjudicable a rastros de granos GM por la manipulación de ambas especies por el proveedor o por contaminación durante la extracción de ADN. A pesar de esto en las **Figuras 22 y 23** se muestra que la presencia del transgén es muy superior en la soja GM y por lo tanto se decidió continuar con los experimentos con estos granos de soja, denominando a la muestra con trazas del transgen “control” y la que tiene mayor cantidad del transgén “soja GM”.

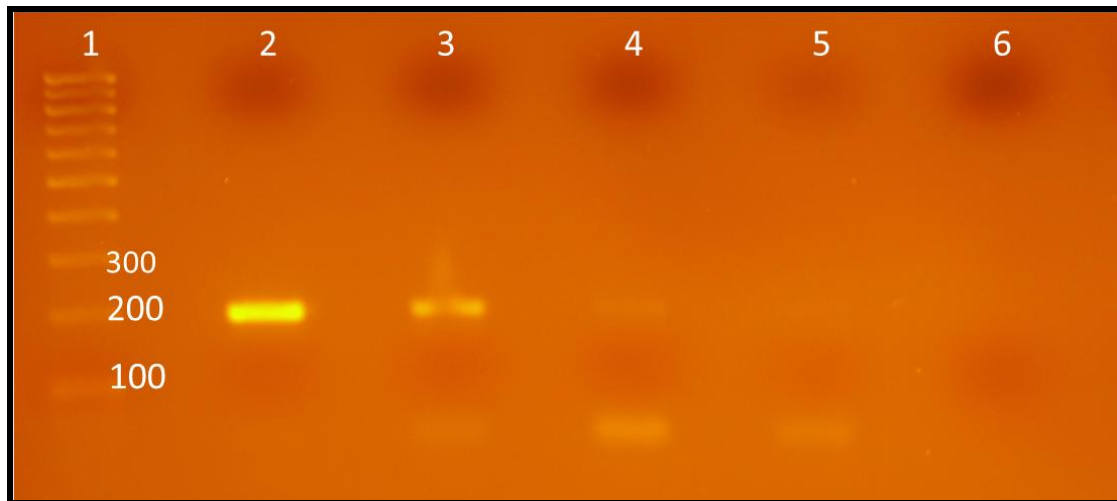


Figura 22. PCR para el promotor CaMV E35S en soja. Orden de siembra de calles: 1: 100bp, 2: Soja GM, 3: Soja GM (dilución ½), 4: Soja control, 5: Soja control (dilución ½), 6: Control negativo.

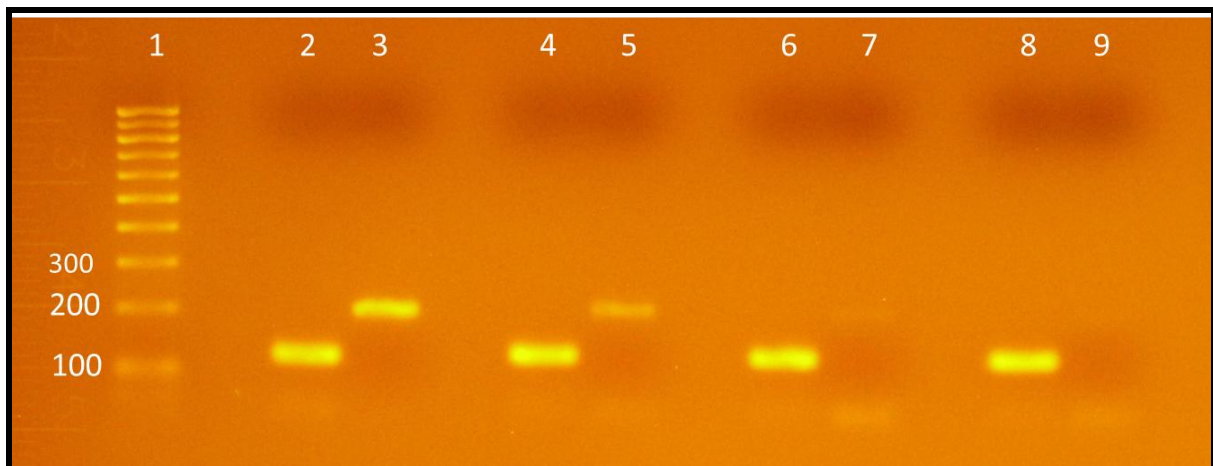


Figura 23. Evaluación de transgénesis en muestras de soja. Orden de siembra de calles: 1: 100bp, 2: Soja GM/lecitina, 3: Soja GM/transgen, 4: Soja GM/lecitina (dilución ½), 5: Soja GM/transgén (dilución ½), 6: Soja control/lecitina, 7: Soja control/transgen, 8: Soja control/lecitina (dilución ½), 9: Soja control/transgen (dilución ½).

Ya se ha estudiado previamente los efectos de una PCR para una solución de ADN mezcla de GM y no GM. Cuando la concentración de ADN GM es menor al 5%, la intensidad de la banda comienza a decaer notablemente, siendo sensible hasta 0.1% (James D, 2003). Teniendo esto en cuenta, y observando los resultados obtenidos, podemos concluir que la presencia del transgén en las muestras control (soja orgánica) es notablemente inferior a la de la soja GM, más aun teniendo en cuenta que se comenzó con igual concentración de ADN

total y que el tamaño de las bandas del control interno es igual.

En función de los resultados obtenidos se decidió realizar los ensayos *in vivo* utilizando los granos de soja disponibles, ya que se pudo diferenciar los granos OGM de los granos orgánicos (control) mediante la técnica de PCR. Adicionalmente se tiene la certeza de que ninguna de las variedades fue sometida a insecticidas o herbicidas. Finalmente, se cuenta con suficiente cantidad de ambos como para realizar los medios de cultivo para todos los ensayos.

5.2 ENSAYOS *IN VIVO* EN EL MODELO DE *DROSOPHILA*

Después de evaluar las diferentes muestras de cultivos disponibles de soja y maíz, mediante técnicas de biología molecular, y teniendo en cuenta la poca disponibilidad de maíz, se decidió utilizar en este proyecto medios a base de soja, en los que se logró identificar con claridad la diferencia en la presencia del transgén entre el cultivo control y el cultivo genéticamente modificado. En base a esto, se hicieron medios de cultivo idénticos, siendo la única diferencia el tipo de soja (control y OGM).

5.2.1 ENSAYO DE PRODUCTIVIDAD

Se define **productividad** como el número de moscas vivas que surgen de cierto número inicial de moscas sometidas al consumo del medio de cultivo que contiene el tratamiento, es decir, la progenie obtenida.

Para este ensayo se sexaron las moscas obtenidas de F1 y se colocaron 6 parejas en cada vial. Los tratamientos ensayados contenían soja genéticamente modificada (GM) y soja control. Se realizaron 5 replicas de cada tratamiento.

Luego de colocar los adultos sincronizados F1 en los viales (**Figura 24**), se sometieron durante 10 días al consumo de alimento, tiempo durante el cual se realizó la ovipuesta en el mismo medio. Pasado este tiempo se retiraron los adultos de los viales. A partir del día en que emergió el primer adulto se censaron todos los adultos emergidos durante los próximos 10 días (posterior a la primera emergencia).

En las condiciones de trabajo, *Drosophila* presentaba un ciclo de vida aproximado de 14 días entre la puesta de los huevos y la emergencia de las moscas adultas. Se eligió entonces

contar las moscas emergentes durante 10 días luego de emergida la primera.

De esta manera, si las primeras moscas emergentes al día 1 hubieran colocado huevos, para el día 10 aún no habrían emergido moscas procedentes de dichos huevos.

A medida que los adultos emergían se los retiraban del vial. Esa metodología se aplicó para cada vial de cada tratamiento.

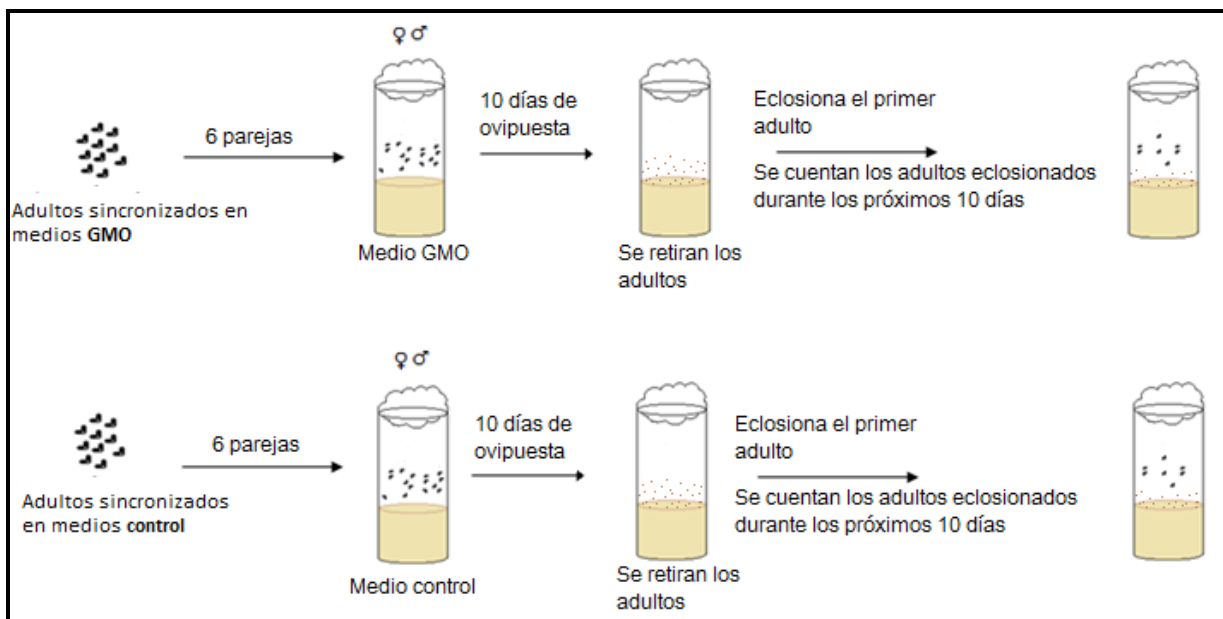


Figura 24. Metodología utilizada en el ensayo de productividad. Se toman adultos sincronizados (F1), se sexan y se colocan 6 parejas en cada vial (5 réplicas para cada tratamiento). Se someten durante 10 días al consumo de alimento, tiempo durante el cual se realiza la ovipuesta, luego se retiran los adultos y se espera a que eclosionen las moscas. Luego de emergido el primer adulto, se cuentan los adultos por 10 días consecutivos. A medida que se van contando, los adultos son retirados.

A partir de la obtención de esos datos, se comenzó a analizar la estadística de los mismos. Primero se define el modelo estadístico para este ensayo. Para esto se parte de la base de que la cantidad de adultos obtenido en cada tratamiento es resultado de la media poblacional, es decir de la cantidad normal o esperable de adultos nacidos de moscas parentales sometidas a un alimento control por 10 días; a esta cantidad se le agrega el efecto que causa el consumo del tratamiento, que puede aumentar o disminuir la media poblacional; finalmente se debe considerar el error aleatorio, lo esperable es que al ser muestras aleatorias este error sea aproximadamente igual en todos los casos. Por lo tanto el modelo sería el

siguiente:

$$\text{Cantidad de adultos nacidos} = \text{Media poblacional} + \text{Efecto tratamiento} + \text{Error aleatorio}$$

Primero se analizó la estadística descriptiva a partir de las medidas resumen, las cuales describen estadísticamente a los datos de las variables e incluyen la media, mediana, el coeficiente de variación, desvío estándar, el mínimo y máximo valor. Se observa una leve diferencia en las medias, observándose una leve diferencia en la productividad media, siendo la de control superior en menos del 10%

Tabla 10. Medidas resumen de la variable en estudio

Estadística descriptiva de la variable productividad, según el tratamiento aplicado, distinguiendo entre sexos.

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	C.V.	Min	Max	Mediana
Control	Productividad	5	186,2	22,03	11,83	162	220	178
OGM	Productividad	5	176,2	38,36	21,77	111	213	187

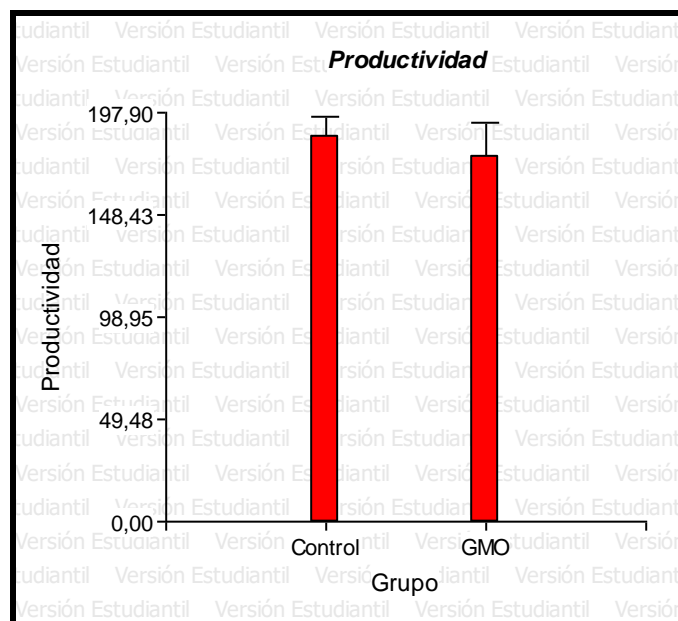


Figura 25. Comparación de productividad entre tratamientos. Comparación de la productividad obtenida de someter a *D. melanogaster* a distintos tratamientos control (soja orgánica) y OGM (soja genéticamente modificada) . El eje vertical indica el número de moscas que emergieron tras 10 días del primer adulto que emergió.

Para la prueba de t se plantearon dos hipótesis estadísticas. La primera se llama hipótesis de no efecto o nula (H0), la cual supone que no hay una variación entre las condiciones evaluadas o, dicho de otra forma, que no hay efecto producido por el tratamiento. La segunda hipótesis o H1 se llama hipótesis de efecto, la cual suele coincidir con la hipótesis de experimentación planteada en un trabajo de investigación.

Aplicado a este ensayo en particular, sería:

H0: el tratamiento con OGM no afecta al número de moscas vivas que nacen de cada vial.

$$\mu \text{ OGM} = \mu \text{ No OGM}$$

H1: el tratamiento con OGM si afecta al número de moscas vivas que nacen en cada vial.

$$\mu \text{ OGM} \neq \mu \text{ No OGM}$$

La **Tabla 11** contiene los datos obtenidos por el software al realizar la prueba de t, mediante la cual se realiza una comparación entre los tratamientos.

Tabla 11. Resultados prueba t para productividad

	OGM	Control
n	5	5
Media	176,2	186,2
p-valor	0,63	

El P valor es mayor a alfa (0.05) por lo que no rechazo H0, no se encontraron evidencias de que el tratamiento con OGM afecte la productividad.

5.2.1.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE PRODUCTIVIDAD

En todos los ensayos realizados, el análisis estadístico fue realizado utilizando el software Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

Primero fue necesario identificar las variables. La unidad experimental en este caso es el vial conteniendo 12 moscas (6 parejas). La variable respuesta es la cantidad de adultos que

surgieron luego de haber expuesto a sus padres a las diferentes variedades de alimento, es una variable cuantitativa discreta. La variable independiente es el tratamiento asignado. El azar intervino al asignar las moscas a cada tratamiento.

Debido a que se trata del análisis de dos grupos, los resultados del índice de productividad fueron analizados mediante la **prueba de t para muestras independientes**.

Luego de efectuada la estadística descriptiva, para realizar el análisis estadístico de esta variable se debe controlar que se cumplan los supuestos de la prueba estadística a utilizar (**Anexo IV**):

- La escala de la variable debe ser al menos de intervalo
- Las muestras deben ser aleatorias y las observaciones independientes
- Las variables deben distribuirse normalmente.

5.2.2 ENSAYO DE SUPERVIVENCIA

Definimos **supervivencia** como el cociente que resulta de dividir el total de moscas vivas en un vial una vez finalizado el experimento a los 40 días, sobre el número inicial de moscas vivas en ese vial.

El protocolo consiste en tomar adultos F1 sincronizados. Es importante que la edad sea similar para evitar efectos en la supervivencia provocados por una diferencia del tiempo de vida de las moscas. Se colocan 15 adultos por vial, armándose 5 viales para cada tratamiento y para cada sexo. Las moscas para este ensayo fueron previamente separadas por sexo, tratando por separado a los machos y a las hembras. El objeto de dicha distinción es el de eliminar posibles efectos sexo-específicos, ya que se sabe que las hembras tienden a ser más longevas (Linford *et al*, 2013).

Una vez armados los viales, se procedió a realizar un conteo periódico de las moscas vivas. 2 veces por semana, cada vial fue repicado a uno con alimento fresco, a fin de mantener las condiciones adecuadas para el desarrollo de las moscas. En caso necesario, los medios fueron hidratados durante la semana.

El esquema de la **Figura 26** permite visualizar la línea de trabajo mantenida para este ensayo.

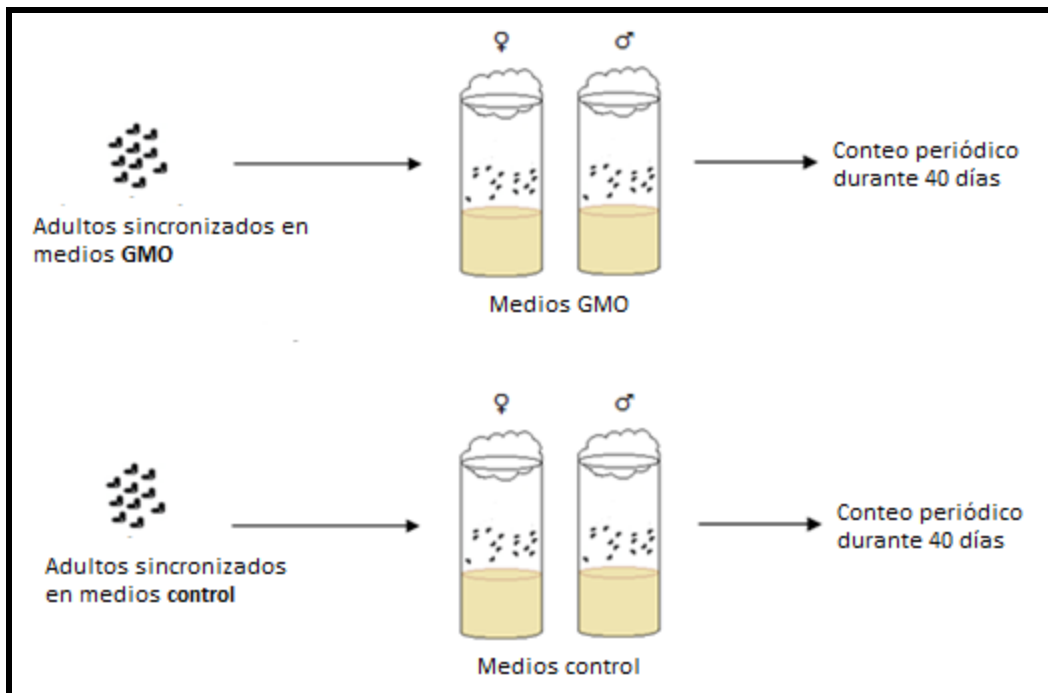


Figura 26. Metodología utilizada en el ensayo de supervivencia. Se toman adultos sincronizados (F1), se sexan y se colocan 15 moscas por cada vial (5 réplicas para cada tratamiento, tratando machos y hembras por separado). Se procede a contar las moscas vivas, periódicamente, durante 40 días. Dos veces por semana se efectúan repiques para mantener los viales en buenas condiciones.

A partir de los datos obtenidos del conteo, se grafica la cantidad de moscas vivas en función del tiempo medido en días (**Figura 27**). Si bien se observan tendencias similares, se puede ver que para las hembras, las moscas expuestas al tratamiento con OGM presentaron un mayor índice de supervivencia.

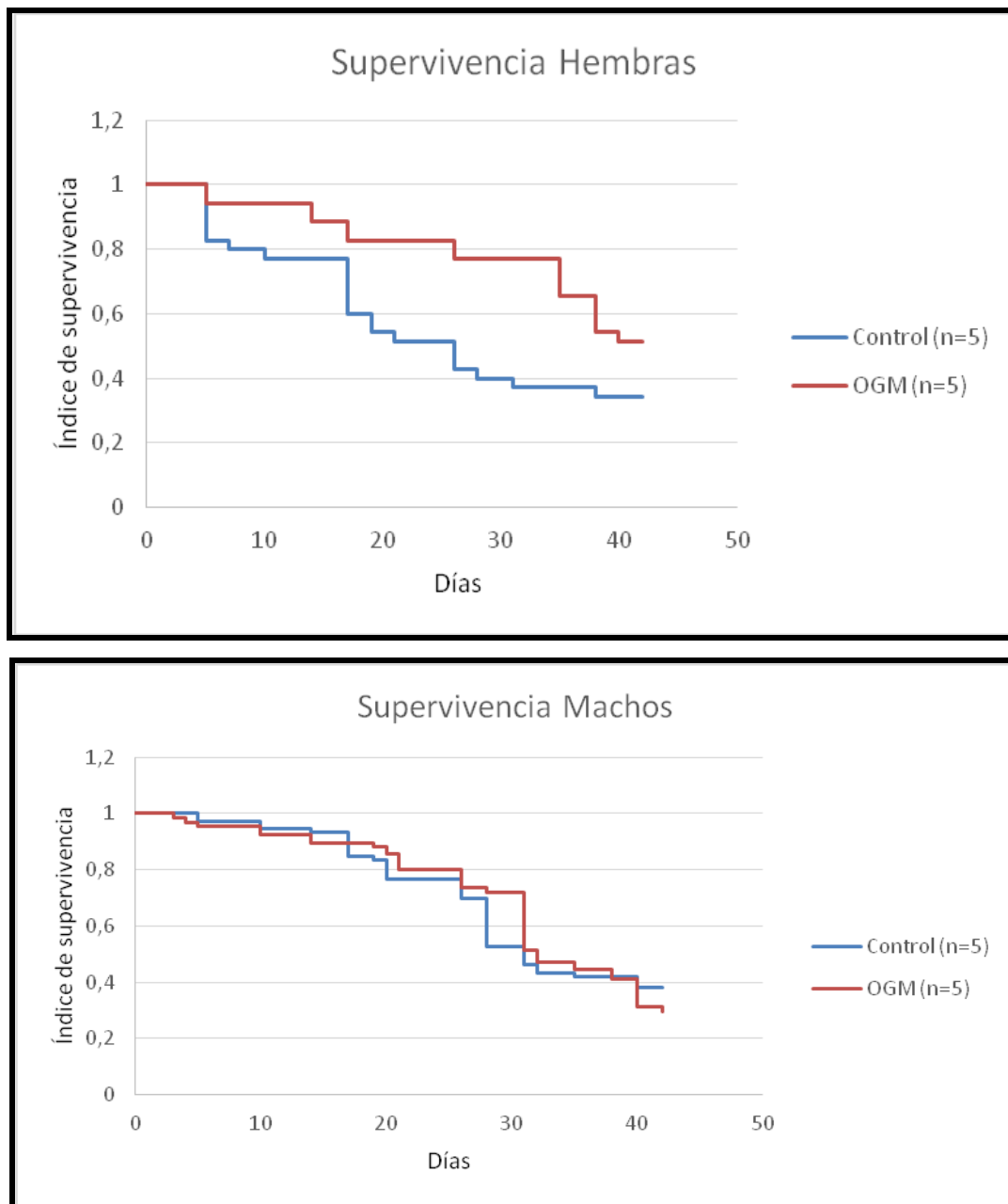


Figura 27. Curvas de supervivencia para los alimentos analizados. Se presenta un gráfico de sobrevida para hembras (arriba) y uno para machos (abajo) durante 40 días. La cantidad de moscas se muestra como un índice de supervivencia, correspondiente al cociente entre la cantidad de moscas vivas al momento de la medición sobre el total de moscas vivas iniciales.

Para realizar el análisis estadístico, se calcularon índices de supervivencia a los 40 días (IS40). Se definió dicho índice en este caso como el número de moscas que ha sobrevivido al

tratamiento con un determinado alimento a los 40 días sobre el número de moscas iniciales. Se analizaron los IS40 para cada tratamiento y cada sexo a los 40 días.

En primera instancia se procedió a realizar la estadística descriptiva de los datos.

Teniendo en cuenta el ensayo anterior, el modelo estadístico para este ensayo es el siguiente:

$$IS40 = \text{Media poblacional} + \text{Efecto del tratamiento} + \text{Error aleatorio}$$

Tabla 12. Estadística descriptiva del índice de supervivencia

Estadística descriptiva de la variable supervivencia, según el tratamiento aplicado, distinguiendo entre sexos.

Sexo	Tratamiento	n	Media	D.E.	C.V.	Min	Max	Mediana
Hembra	Control	5	0,34	0,16	47,51	0,14	0,57	0,29
Hembra	OGM	5	0,51	0,19	37,27	0,29	0,71	0,43
Macho	Control	5	0,38	0,13	34,41	0,29	0,60	0,33
Macho	OGM	5	0,31	0,07	23,24	0,25	0,42	0,27

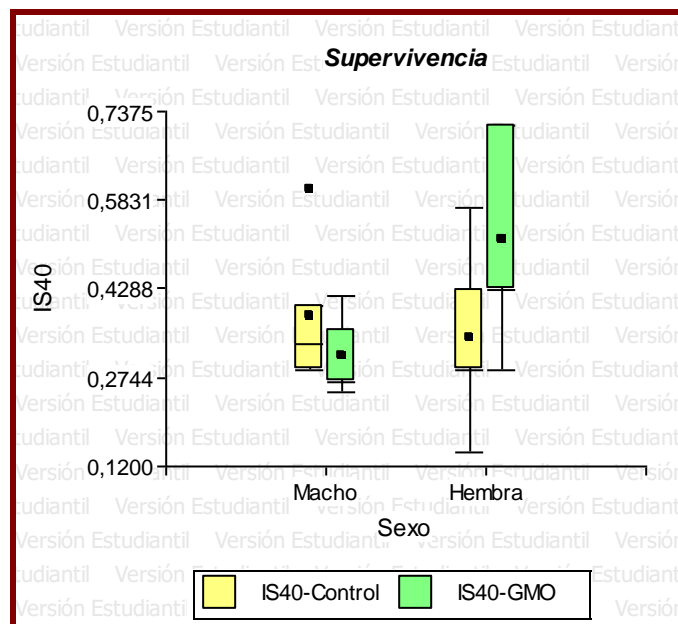


Figura 28. Box plot del índice de supervivencia

Se puede observar, mediante la estadística descriptiva (**Tabla 12**), la diferencia en las medias, siendo superior en OGM para las hembras, y mayor en el control para los machos

Una vez analizada la estadística descriptiva, para el análisis estadístico de los datos, se efectúa una prueba de t.

En este caso las hipótesis planteadas son:

Ho: las poblaciones no difieren en su índice de supervivencia.

H1: Las poblaciones difieren en su índice de supervivencia.

$$\mu_{IS40 \text{ Control}} = \mu_{IS40 \text{ OGM}}$$

$$\mu_{IS40 \text{ Control}} \neq \mu_{IS40 \text{ OGM}}$$

Si se establece un nivel de significación de 0,05, un p-valor menor a dicho número supondría rechazar la hipótesis nula.

Tabla 13. Resultados prueba de t para supervivencia en hembras

	OGM	Control
n	5	5
Media	0,514	0,343
p-valor	0,17	

Tabla 14. Resultados prueba de t para supervivencia en machos

	OGM	Control
n	5	5
Media	0,311	0,381
p-valor	0,33	

De los gráficos anteriores puede observarse que, tanto para machos como para

hembras, el p-valor de la prueba estadística es mayor a alfa. Por lo tanto, no se rechaza H_0 , no hay evidencia entonces de que la soja GM afecte al índice de supervivencia de estos individuos.

En el gráfico para la supervivencia de hembras se observa una tendencia mayor para las moscas alimentadas con OGM, dando una apariencia de mayor índice de supervivencia. Pero antes del ensayo se definió que la prueba estadística se basa en el día 40. Para ese momento se observa que los valores tendieron a igualarse, manteniéndose el p-valor por encima de alfa.

5.2.2.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE SUPERVIVENCIA

Primero fue necesario identificar las variables. La unidad experimental en este caso es el vial conteniendo 15 moscas. La variable respuesta es la cantidad de adultos vivos que permanece en el vial a los 40 días de estar sometidos a cierto tratamiento. Esta es una variable cuantitativa continua. La variable independiente es el tratamiento asignado. El azar intervino al asignar las moscas a cada tratamiento, y en la asignación del tratamiento a cada grupo.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 5 réplicas tanto para hembras como machos, debido a que sus expectativas de vida son distintas.

Al igual que en el caso anterior, luego de efectuada la estadística descriptiva, para realizar el análisis estadístico de esta variable se debe controlar que se cumplan los supuestos de la prueba estadística a utilizar.

5.2.3 ENSAYO DE DEPRIVACIÓN DE ALIMENTO O STARVING

Starving, del inglés “hambruna”, consiste en someter a las moscas a una situación de privación de alimento que, a la larga, terminará por generar su muerte. Asimismo, la inanición genera en *Drosophila* una fuerte situación de estrés.

El objetivo de este ensayo es medir si la resistencia de las moscas a dicha situación de estrés se ve afectada o no, según el alimento que hayan consumido anteriormente. Es decir, se busca evaluar si el consumo de cierta variedad de soja antes de ser sometidas a *starving* afecta su supervivencia.

El protocolo para este ensayo consiste en tomar moscas F1 sincronizadas, sexarlas y colocarlas en los viales de *starving*, que consisten en agarosa al 1% (**Anexo III**). Este medio fue preparado con agar y agua. Su función es proveer a las moscas hidratación, pero no alimento. De esta manera, la muerte se ve causada realmente por hambruna.

Se armaron, para cada sexo y condición, 5 viales con 10 moscas cada uno. Una vez colocadas las moscas en los viales con agarosa, se realizan conteos sucesivos para ir registrando la cantidad de moscas que van muriendo. (**Figura 29**).

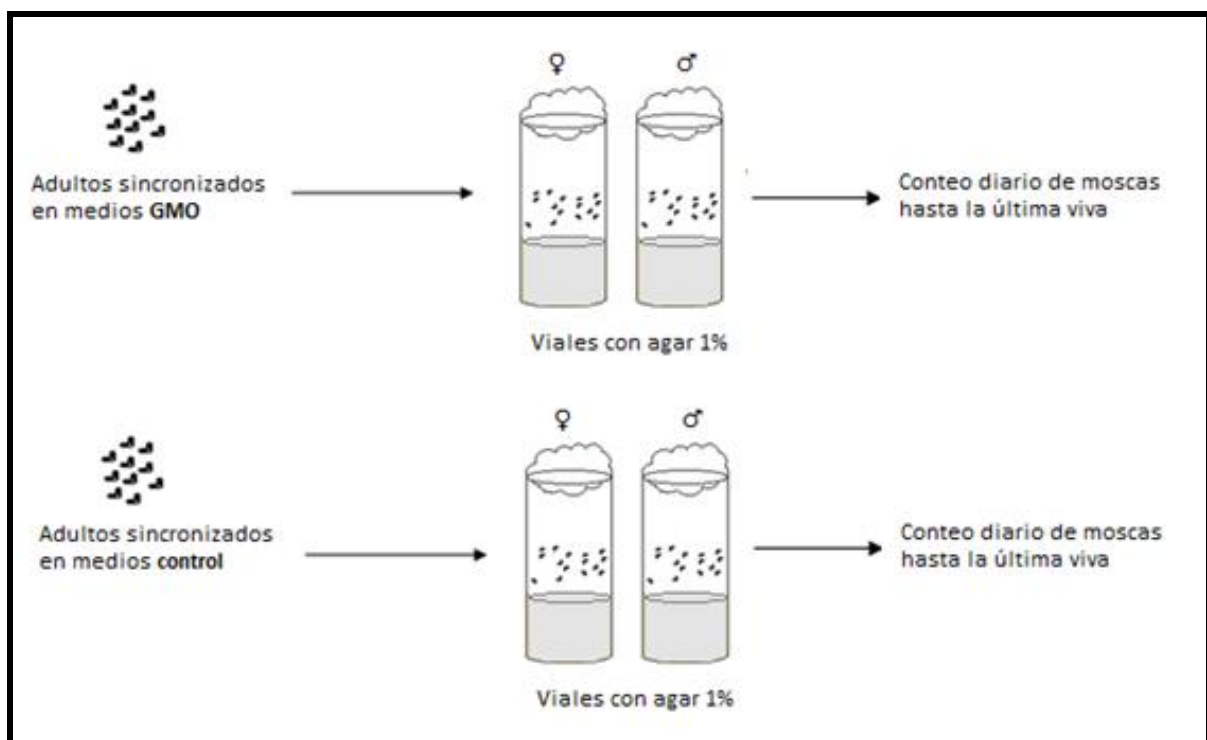


Figura 29. Metodología utilizada en el ensayo de *starving*. Una vez obtenidos los adultos sincronizados, los mismos son sexados y colocados en viales de *starving*, los cuales contienen únicamente agar 1% (otorgando hidratación pero no alimento para las moscas). Se armaron, para cada sexo y condición, 5 viales con 10 moscas cada uno. Se realizan sucesivos conteos de moscas vivas hasta la última muerta.

Con los resultados obtenidos se procedió a graficar la cantidad de moscas vivas promedio en función del tiempo (horas), se obtuvieron gráficos en los que se observan tendencias similares en ambos tratamientos, tanto en machos como en hembras (**Figura 30**).

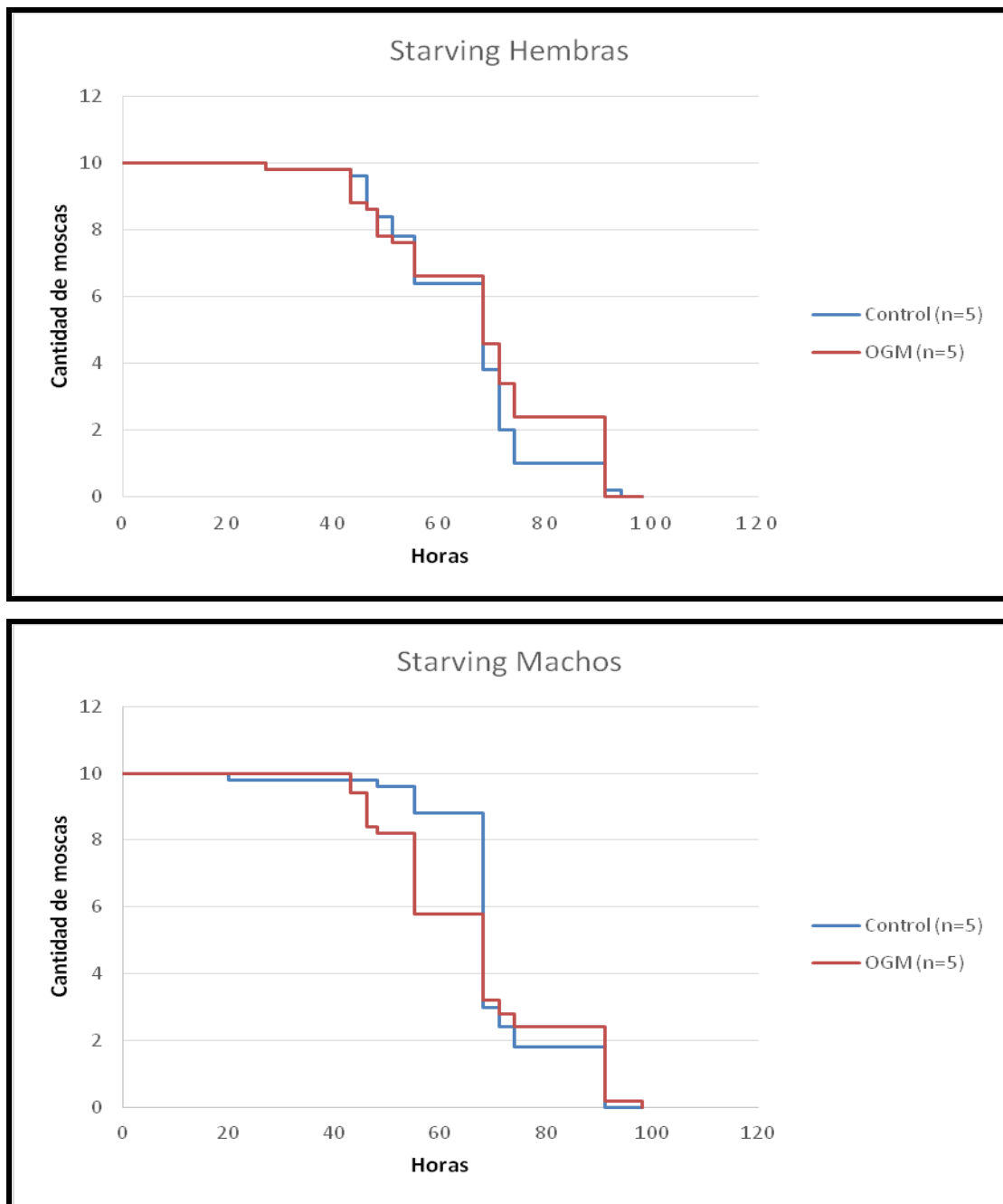


Figura 30. Evolución de *starving*. Se presenta un gráfico de evolución de *starving* para hembras (arriba) y uno para machos (abajo). El eje vertical se corresponde con la cantidad de moscas vivas, en el eje horizontal se muestra la cantidad de horas transcurridas hasta la última mosca viva.

El modelo estadístico para este ensayo es el siguiente:

$$\text{Tiempo de vida media} = \text{Media poblacional} + \text{Efecto del tratamiento} + \text{Error aleatorio}$$

Como se mencionó anteriormente, las hembras y machos tienen expectativas de vida distintas, por lo que se realizó un ensayo para cada uno, los cuales se analizarán a continuación por separado.

Tabla 15. Estadística descriptiva *starving*

Estadística descriptiva del ensayo de *starving*, según el tratamiento aplicado, distinguiendo entre sexos.

Sexo	Tratamiento	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Mediana
Hembra	Control	5	64,74	5,71	8,82	58,4	73,7	64,4
Hembra	OGM	5	67,48	3,44	5,10	61,6	70,3	68,6
Macho	Control	5	70,28	6,95	9,89	61,4	77,2	70,6
Macho	OGM	5	64,84	8,07	12,45	52,4	73,8	64,3

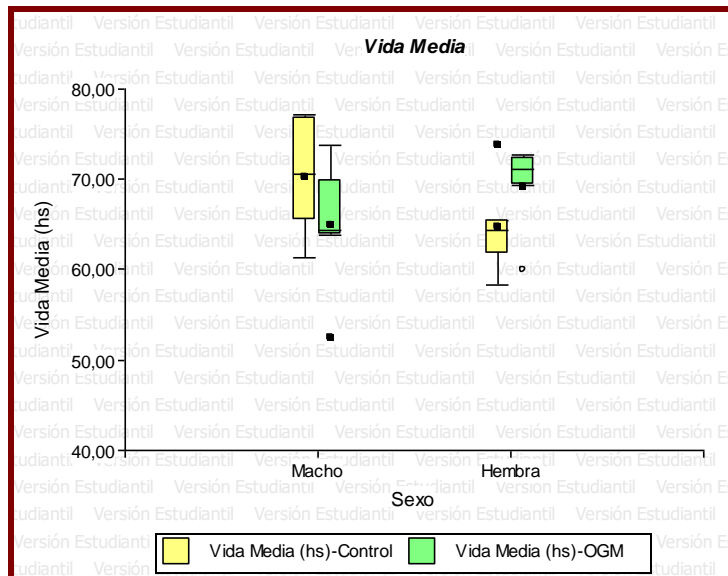


Figura 31. Box plot ensayo de *starving*

Para esta prueba se plantean como hipótesis:

Ho: las poblaciones no difieren en su vida media

H1: poblaciones difieren en su vida media

Tabla 16. Resultados prueba de t para *starving* en machos

	OGM	Control
n	5	5
Media	64,84	70,28
p-valor	0,29	

Tabla 17. Resultados prueba de t para *starving* en hembras

	OGM	Control
n	5	5
Media	67,48	64,74
p-valor	0,39	

De los gráficos anteriores puede observarse que, tanto para machos como para hembras, el p-valor de la prueba estadística es mayor a alfa. Por lo tanto, no se rechaza H_0 , no hay evidencia entonces de que la soja GM afecte la resistencia al *starving*.

5.2.3.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE STARVING

Al igual que los casos anteriores, primero fue necesario identificar las variables. La unidad experimental en este caso es el vial conteniendo 10 moscas. La variable respuesta es el tiempo medio de vida, cuando las moscas son sometidas a la inanición. Es calculada a partir del tiempo donde la mitad de las moscas iniciales se encontraban muertas. Esta es una variable cuantitativa continua. La variable independiente es el tratamiento asignado. El azar intervino al asignar las moscas a cada tratamiento, y en la asignación de tratamiento a cada grupo.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 5 réplicas tanto para hembras como machos, debido a que sus expectativas de vida son distintas. El factor fue el tratamiento

Luego de efectuada la estadística descriptiva, para realizar el análisis estadístico de esta variable se debe controlar que se cumplan los supuestos de la prueba estadística a utilizar.

6 DISCUSIÓN

6.1 Biología molecular

Luego de la puesta a punto para las condiciones de trabajo del laboratorio de biotecnología, se encontró en la PCR de tiempo final, un método eficiente para la detección de secuencias transgénicas en el ADN de los cultivos elegidos. Las publicaciones tomadas como referencia del “Curso de formación sobre Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos” (Querci M. *et al*, 2007) probaron ser de utilidad.

La principal complicación encontrada fue en la molienda del grano. Debido a la imposibilidad de conseguir directamente la harina de ambas variedades, se molieron las muestras en el laboratorio. Al usar el mismo equipo y misma procesadora para moler los granos, se requiere un gran esfuerzo evitar la contaminación con muestras previas. Para solucionar esto se implementó un método alternativo para la molienda de granos. Se los separó en pequeños sobres de nylon descartables y se los golpeó con un martillo por fuera. De esta forma se evitó la contaminación entre diferentes muestras, e incluso se logró hacer extracción de ADN de un único grano, pero se sacrificó rendimiento, debido a que la molienda resultó menos homogénea. La capacidad de obtener las muestras lo más molidas y homogéneas posibles tiene una gran influencia en el rendimiento de la extracción de ADN. Para futuras extracciones se recomienda evaluar un lavado de los granos, que permita eliminar de su superficie, posibles restos de material biológico ajeno.

La cuantificación fue la principal dificultad que se encontró al trabajar con el protocolo de extracción de ADN. Al tener bajo rendimiento se obtuvo poco volumen final como para cuantificar correctamente por espectrofotometría, por lo que se decidió cuantificar por gel. Este problema no resultó ser de gravedad debido a que la sensibilidad de la técnica de PCR admite un amplio rango de concentraciones iniciales de ADN. También se debe mencionar que la pureza lograda con este método fue la más alta, comparada con otros protocolos ensayados. Previamente se habían probado otros métodos de extracción de ADN basados en beta-mercaptoetanol (Join Research Centre, 2008), pero se los descartó por la cantidad de impurezas que presentaba el ADN obtenido (datos no mostrados en la tesis). No

obstante, este otro método era más fácil de cuantificar por el alto rendimiento que se obtenía.

Al observar los resultados de los ensayos de PCR, podemos concluir que contamos con un método eficiente para la detección de secuencias transgénicas ADN genómico de soja y de maíz. La gran sensibilidad del método observada en este trabajo concuerda con la capacidad de amplificar la secuencia transgénica en una concentración a partir del 0.1% observado en publicaciones previas (Kodama T, 2011). También observamos que en muestras donde el transgén está en genómico en baja concentración, baja la intensidad de la banda. Estos resultados ya se habían observado (James D, 2003) a partir de concentraciones menores al 5% y nos permiten concluir que la técnica resultó eficiente para comparar la concentración de ADN GM en las muestras disponibles.

Concluimos que para agilizar futuras detecciones de OGM utilizando las herramientas que ofrecen los UADE Labs, se deberá trabajar en una puesta a punto de una PCR multiplexada, o intentar unificar los ciclos de PCR para evaluar diferentes secuencias en un único ciclado (por ejemplo el promotor transgénico y el control interno). Durante este trabajo no fue posible realizarlo, ya que los primers disponibles cuentan con temperaturas de annealing muy separadas entre sí. De lograrse esta técnica se podría reducir a la mitad el tiempo necesario para las reacciones de PCR, y el uso de la termocicladora será más eficiente ya que se podrán hacer más ensayos en simultáneo.

6.2 Modelo Biológico

Como se postuló en una investigación previa en el laboratorio de biotecnología de UADE (Fernández Caballero y Martínez, 2015) el trabajo con el modelo *D. melanogaster* probo tener varias ventajas para la evaluación de factores dietarios. Permite controlar estrictamente el medio de cultivo (dieta simple), así como las condiciones del medio (temperatura, luz) y la facilidad para obtener varios individuos genéticamente idénticos. Adicionalmente, el manejo fácil para controles demográficos (Linda Partridge *et al*, 2005), resultó ser un factor sumamente relevante para observar os resultados de los ensayos.

Las moscas ya probaron ser eficientes para el estudio del efecto de la dieta, tanto en parámetros demográficos como la supervivencia (Pletcher S. *et al*, 2005), como en varios parámetros fisiológicos importantes, como el sueño, la fertilidad y los hábitos de alimentación (Bazzell B. *et al*, 2013). Dentro de las limitaciones del trabajo con el modelo, se encuentra la

imposibilidad de abordar el estudio de problemáticas características del consumo en mamíferos, como el efecto en el tracto gastrointestinal, páncreas e hígado, temática demandada en publicaciones que cuestionan la inocuidad de los OGM (Artemis Dona e Ioannis S. Arvanitoyannis, 2009).

Es importante destacar la ventaja que presenta *D. melanogaster*, al desarrollarse dentro del laboratorio con una dieta simple, que nos permitió estar siempre en control del alimento que ingerían los individuos. En cuanto a la manipulación, el mayor inconveniente encontrado durante los experimentos de longevidad, donde el medio de cultivo puede deteriorarse, generando humedad dentro del vial, y como consecuencia las moscas pueden quedar atrapadas y morir. Esto puede afectar los resultados, bajando la longevidad a causa de un defecto de la técnica. La solución a este problema consistió en una puesta a punto de la concentración del anti fúngico, trabajar con temperaturas bajas, dentro del rango recomendado para *Drosophila*, reducir la cantidad de individuos por vial y repicar los viales 2 veces por semana.

6.3 Resultados de ensayos *in vivo*

Nuestro trabajo muestra que los cultivos GM no tienen efecto adverso en el modelo utilizado y que son equivalentes a los alimentos no GM. Estos resultados están en concordancia con publicaciones previas (Nicolia *et al*, 2014), que enuncian que los cultivos GM no tienen efectos en el consumo humano y animal. La inocuidad que observamos en las moscas en condiciones experimentales, es similar a ensayos de campo publicados recientemente (National Academy of Sciences, 2016) en donde se remarca que no hay un efecto sobre la diversidad de plantas o de insectos, en los campos donde se siembra cultivos GM. Por último, según nuestros ensayos, el riesgo del consumir OGMs no es mayor que el riesgo de consumir vegetales mejorados por métodos convencionales, demostrando concordancia con la declaración de la American Association for the Advancement of Sciences, que enuncia que al no haber mayor riesgo consumiendo OGMs, no considera necesaria una etiqueta que los diferencia de los demás alimentos.

Será de gran importancia la para discusión en curso y futuras, entender las diferencias entre los posibles efectos de los transgénicos (como técnica de ingeniería genética) y los efectos de herbicidas y otros químicos, que en ciertas ocasiones se utilizan en asociación con

los OGMs. En recientes trabajos se alzan preguntas sobre la seguridad de los OGM, por posible relación entre el glifosato y el cáncer de mama (Thongprakaisang S. *et al*, 2013), relación del glifosato con Parkinson y Alzheimer (Samsel, A y Seneff, S, 2013) y relación del glifosato con el mal estado de salud crónico, tanto de animales como de humano (Krüger M. *et al*, 2014).

Una publicación de relevancia para comparar con nuestros resultados es “Organically Grown Food Provides Health Benefits to *Drosophila melanogaster*” (Ria Chhabra *et al*, 2013). En sus ensayos evaluaron los efectos que tenía la comida en las moscas, comparando orgánico vs. convencional (ambos comprados directamente en el supermercado) y encontraron diferencias en la supervivencia y en la fertilidad, siendo superior en el alimento orgánico. Consideramos, a la luz de nuestros resultados, que estas diferencias podrían deberse al uso de diferentes herbicidas, insecticidas o fertilizantes en la cosecha convencional que no están presentes en la orgánica, y no debido a la diferencia por la presencia o no de modificaciones genéticas.

Como se enuncio en la sección de materiales y métodos, la selección cuidadosa de granos sin insecticida ni herbicidas, nos permitió aislar a la modificación genética como la única variable. Nuestro trabajo aporta datos para considerar que los potenciales efectos observados en otras publicaciones, son a causa de productos químicos que se usan en tándem con las semillas, y no por la modificación genética en sí misma.

6.4 Sociedad y percepción de los OGM

Durante el desarrollo de este trabajo el acceso a los cultivos para los experimentos fue una de las mayores dificultades. La escasa disponibilidad de maíz y soja libre de modificaciones genéticas, o vendedores desinformados fueron parte de las complicaciones encontradas. Actualmente la disponibilidad de productos orgánicos no marca claramente si depende únicamente de la forma de cultivo, o si también incluye el tipo de semilla.

Actualmente se observa una demanda de los consumidores por productos que consideran más sanos (Lu Lu y Dogan Gursoy, 2016). El debate actual está impulsado por una serie de factores que van más allá del miedo a la modificación genética. Sin duda, resulta muy difícil separar en la mente del consumidor la modificación genética, del uso de herbicidas (Rhodora R Aldemita, 2015).

Con respecto a los locales especializados en la venta de productos orgánicos, hemos encontrado resultados contradictorios al evaluar los productos. Los granos de soja orgánicos no mostraron evidencia de modificación genética (resultados en la **sección 5.1.2**). También se evaluaron 2 muestras diferentes de maíz orgánico: una de las cuales resultó ser libre de modificaciones genéticas (resultados en la **sección 5.1.1**) y la otra mostraba claras evidencias de tener el promotor transgénico (**Anexo V**). Este resultado, que proviene de un solo ensayo, aporta evidencia para señalar que no todos los granos vendidos en CABA como orgánicos, se encuentran libres de eventos transgénicos. Esto dará origen a una nueva investigación, en la que las técnicas de PCR puestas a punto en este trabajo serán de gran utilidad.

6.5 Transferencia de conocimiento

El conocimiento del modelo biológico y su manipulación fue utilizado en numerosos trabajos prácticos en materias de las carreras de Biotecnología, Bioinformática e Ingeniería en alimentos. Adicionalmente se han realizado en 2015 y 2016 seminarios de transferencia para compartir el conocimiento adquirido sobre *Drosophila* con otros alumnos que realizan su Proyecto Final con este modelo.

Se observó que la PCR para secuencias transgénicas es un claro ejemplo de la utilidad de la técnica. Consideramos que la posibilidad de tipificar muestras de alimentos es un vínculo entre el área de las BIOciencias y la Ingeniería en Alimentos, que podrá ser explotado en el contexto de la Fundación UADE.

Previamente se presentaron los avances de este trabajo en seminarios de difusión interna en la modalidad de poster. Adicionalmente se realizará un curso durante 2016 para compartir las herramientas adquiridas durante este trabajo.

7 CONCLUSIONES

Durante el trabajo de esta tesis:

- Se logró poner a punto la extracción de ADN de granos de soja y maíz que permitiera la posterior PCR.
- Se logró identificar, mediante la técnica de PCR, la presencia de transgenes y genes endógenos en las especies de soja y maíz.
- Se puso a punto la alimentación del modelo de *D. melanogaster* con nuevas fuentes (soja y maíz).
- No se encontraron evidencias para afirmar que la alimentación con soja GM afecte la productividad en el modelo de *D. melanogaster*, en comparación con una alimentación basada en soja orgánica. No se encontraron evidencias de que el consumo de soja GM afecte el índice de supervivencia en el modelo de *D. melanogaster*, comparado con el consumo de soja orgánica.
- No se encontraron evidencias de que una alimentación con soja GM afecte la resistencia al *starving* en el modelo de *D. melanogaster*, en comparación con una alimentación con soja orgánica.

Consideramos que el modelo de *D. melanogaster* podrá ser utilizado en futuros ensayos para la medición de toxicidad, adicción, consumo preferencial y tropismo de otros compuestos dietarios de relevancia para el consumo humano o animal.

8 BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, Mark D. *et al.* 2000. *The Genome Sequence of Drosophila melanogaster*. Science, 24 Marzo 2000; Vol. 287 No. 5461; pp 2185-2195; doi: 10.1126/science.287.5461.2185.
- AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCES. (2012). *Statement by the AAAS Board of Directors On Labeling of Genetically Modified Foods*.
- ARIAS, A.M. 2008. *Drosophila melanogaster and the development of biology in the 20th century*. Methods in molecular biology, 2008; 420: 1-25. doi: 10.1007/978-1-59745-583-1_1-. PMID: 18641938.
- AYYADURAI, V.A.S. and Deonikar, P. (2015) *Do GMOs Accumulate Formaldehyde and Disrupt Molecular Systems Equilibria? Systems Biology May Provide Answers*. *Agricultural Sciences*, 6, 630-662. doi: 10.4236/as.2015.67062
- BIESSMANN, Harald. Noviembre 1985. *Molecular analysis of the yellow gene (y) region of Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, pp 7369-7373, Genetics.
- BAZZEL B. *et al.* (2013). Dietary composition regulates *Drosophila* mobility and cardiac physiology. *The Journal of Experimental Biology*, 216(5), 859–868. <http://doi.org/10.1242/jeb.078758>
- CARPENTER JE. *Impact of GM crops on biodiversity*. GM Crops. 2011 Jan-Mar;2(1):7-23. doi: 10.4161/gmcr.2.1.15086. PubMed PMID: 21844695.
- CHANCE RE, Frank BH. *Research, development, production, and safety of biosynthetic human insulin*. *Diabetes Care*. 1993 Dec;16 Suppl 3:133-42. Review. PubMed PMID: 8299470.
- CHHABRA R, *et al.* (2013) Organically Grown Food Provides Health Benefits to *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE 8(1): e52988. doi:10.1371/journal.pone.0052988
- DONA A, Arvanitoyannis IS. Health risks of genetically modified foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009 Feb;49(2):164-75. doi: 10.1080/10408390701855993. PubMed PMID: 18989835.

- GÓMEZ CERÓN, Hugo. 19 Agosto 2008. *Ciclo de vida de Drosophila*. [En línea] Disponible en: <http://benitobios.blogspot.com.ar/2008/08/ciclo-de-vida-de-Drosophila.html>
- JAMES D, Schmidt AM, Wall E, Green M, Masri S. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *J Agric Food Chem*. 2003 Sep 24;51(20):5829-34. PubMed PMID: 13129280.
- JENNINGS, Barbara H. Mayo 2011. *Drosophila - a versatile model in biology & medicine*. *Materials Today*, Mayo 2011; Vol. 14 No. 5; pp 190-195; ISSN: 1369 7021 © Elsevier Ltd 2011.
- JOINT RESEARCH CENTRE (2008) *Report on the validation of a DNA extraction method for maize sedes and grains*
- JoVE Science Education Database. *Essentials of Biology 1: yeast, Drosophila and C. elegans*. An Introduction to *Drosophila melanogaster*. JoVE, Cambridge, MA, doi: 10.3791/5082 (2016)
- KEY S. *et al*. *Genetically modified plants and human health*. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2008; 101(6):290-298. doi:10.1258/jrsm.2008.070372
- KODAMA T, Kasahara M, Minegishi Y, Futo S, Sawada C, Watai M, Akiyama H, Teshima R, Kurosawa Y, Furui S, Hino A, Kitta K. Qualitative PCR method for Roundup Ready soybean: interlaboratory study. *J AOAC Int*. (2011) Jan-Feb;94(1):224-31. PubMed PMID: 21391499.
- LEE, Kwang Pum *et al*. 19-Feb-2008. *Lifespan and reproduction in Drosophila: New insights from nutritional geometry*. *PNAS*, Vol. 105 No. 7, pp 2498-2503.
- LINFORD, N.J., BILGIR, C., RO, J., PLETCHER, S.D. 1-Jul-2013. *Measurement of lifespan in Drosophila melanogaster* [video]. Disponible en: <http://www.jove.com/video/50068>
- LUSHCHAK OV *et al* (2014) *Specific Dietary Carbohydrates Differentially Influence the Life Span and Fecundity of Drosophila melanogaster*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014 Jan; 69(1):3-12. doi: 10.1093/gerona/glt077

- MARCHESANO, Mariana. 2013. *Posibles efectos neurodegenerativos de la falta de función del gen white en Drosophila melanogaster*. Tesina de Licenciatura en ciencias biológicas, Facultad de Ciencias, UDELAR. Disponible en formato .pdf en: <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-16175.pdf>
- MEJÍA, Luis. 2011. *Características y ciclo de vida de la mosca de la fruta Drosophila melanogaster*. Laboratorio de Genética General, FAUSAC. [Documento en línea]. Disponible en: <http://ciber-genetica.blogspot.com.ar/2011/02/guia-basica-para-el-uso-de-Drosophila.html>
- MEYER R. *et al.* (1996). *Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A 203, 339-344.
- MIKO, I. 2008. *Thomas Hunt Morgan and sex linkage*. NatureEducation; 1(1):143.
- MILLER, Conrad. Última actualización: 04 Octubre 2000. *Drosophila melanogaster*. ADW, Animal Diversity Web. [En línea] Disponible en: http://animaldiversity.org/accounts/Drosophila_melanogaster/
- MORA, Francisco, SANTOS, Fabiola y CAMPOS, Héctor Aníbal. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, 2000. *Efecto del doble mutante e//ew//w y del medio de cultivo en la productividad de Drosophila melanogaster*. Acta Biológica Colombiana, Vol. 5 No. 1, pp. 39-45.
- MURRAY MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research. 1980;8(19):4321-4325.
- NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, Engineering, and Medicine. *Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects*. Washington, DC: The National Academies Press, 2016. doi:10.17226/23395.
- NICOLA A. *et al.* *An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research*. Crit Rev Biotechnol. 2014 Mar;34(1):77-88. doi: 10.3109/07388551.2013.823595
- O'CALLAGAN M. *et al.* *Effects of plants genetically modified for insect*

resistance on nontarget organisms. Annu Rev Entomol. 2005;50:271-92.

- PAINE J. A. *et al.* (2005). *Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content.* *Nat Biotech*, 23(4), 482–487. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1082>
- PARTRIDGE L. *et al.* *Dietary restriction in Drosophila.* *Mech Ageing Dev.* 2005 Sep; 126(9):938-50.
- QUERCI M. *et al.* *Curso de formación sobre Análisis de la presencia de organismo genéticamente modificados en muestras de alimentos*, 2007. ISBN: 978-92-79-04831-9
- SAIKY RK. *et al.* *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* *Science.* 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.
- SERALINI GE. *et al.* *Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize.* *Food Chem Toxicol.* 2012 Nov;50(11):4221-31. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.005.
- SUNDARRAM A. & MURTHY T. P. K.. "α-Amylase Production and Applications: A Review." *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 2.4 (2014): 166-175.
- STUDER E. *et al.* *Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize.* *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A.* September 1998, Volume 207, Issue 3, pp 207-213
- STOCKER, Hugo y GALLANT, Peter. 2008. *Getting started - An overview on raising and manipulating Drosophila.* *Methods in Molecular Biology*, 2008; Vol. 420; pp 27-44; doi: 10.1007/978-1-59745-583-1_2.
- TWYMAN, RICHARD. 29 Agosto 2002. *Model organisms: The fruit fly.* [Artículo en línea] Disponible en: http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020807.html
- VAN EENNAAM AL, Young AE. *Prevalence and impacts of genetically engineered feedstuffs on livestock populations.* *J Anim Sci.* 2014 Oct;92(10):4255-78. doi: 10.2527/jas.2014-8124. Epub 2014 Sep 2. Review.

Erratum in: J Anim Sci. 2014 Nov;92(11):5293. PubMed PMID: 25184846

- XU, J. *et al.* (2012). *Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins*. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1171–84. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.020>
- [Anónimo; sin fecha] *Drosophila as a Model Organism, an introduction*. Model Organism Encyclopedia of DNA Elements - Educational Supplement, Science/AAAS. [Artículo en línea]. Disponible en: <http://modencode.sciencemag.org/Drosophila/introduction>
- [Anónimo, sin fecha] *La mosca del vinagre*. Botanical-online [En línea]

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I: Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* incluye cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. La duración del ciclo varía con la temperatura del cultivo. A 25°C el ciclo dura alrededor de 10 días, tratándose de la temperatura óptima; pero a 20°C puede durar unos 15 días. Los cultivos no deben exponerse a temperaturas de 30°C, pues puede resultar en la muerte de las mismas, ni a bajas temperaturas como de 10°C pues se reduce la viabilidad.

HUEVO (0,5 mm): Las moscas hembras adultas comienzan la ovoposición al segundo día de su emergencia, llegando a producir 400 a 500 huevos como máximo en 10 días. Los huevos son ovoides, pequeños, con dos proyecciones que emergen de un extremo, las cuales son aplanadas y le sirven al huevo para no hundirse en el medio de cultivo. El desarrollo embrionario tarda aproximadamente 1 día a 25°C. La larva emerge del huevo.

LARVA (4,5 mm): Es blanca, vermiforme y segmentada. Posee partes bucales de color negro, como los ganchos mandibulares, en una región cefálica estrecha, que penetran el alimento permitiéndoles comer vorazmente. No tiene ojos, por lo cual es ciego, ni apéndices, motivo por el cual se desplazan comiendo. Respiran por tráqueas y poseer poros aéreos en los extremos del cuerpo.

En esta fase la larva come y crece rápidamente. Se pueden identificar tres estadios. El primero y el segundo terminan en mudas, que implican una eliminación de la piel y partes orales, permitiéndole crecer. El tercer estadio termina en la formación de la pupa, tras lo cual la larva deja de comer, se arrastra a una superficie seca. La fase larvaria dura alrededor de 4 días a 25°C.

PUPA (3 mm): Suele considerarse la fase re organizativa del ciclo de vida, pues la mayoría de las estructuras larvarias son destruidas y se desarrollan las estructuras adultas a partir de tejidos embrionarios llamados anlagen, que han permanecido latentes en el animal desde su diferenciación en el huevo. El insecto empupa dentro de la última piel larvaria, la cual se va endureciendo y adquiriendo una tonalidad más oscura. La fase de pupa tarda alrededor de 4 días a 25°C, y emerge el adulto (Imago) de la pupa.

ADULTO (2 mm): Es considerado la fase reproductiva del ciclo. La mosca eclosiona de la pupa, forzando su salida por el extremo anterior. En un inicio, la mosca tiene forma elongada con alas no expandidas. Transcurrida una hora, las alas se expanden y el cuerpo adquiere paulatinamente la forma definitiva de adulto. Comienzan teniendo color claro, pero se van oscureciendo en las primeras horas. Los adultos pueden aparearse 6 horas después de haber emergido. El espermatozoos es almacenado en las espermatecas y en los receptáculos ventrales de la hembra, y es liberado gradualmente al oviducto a medida que se producen los huevos. La hembra empieza a depositar huevos a los 2 días de haber emergido, pudiendo depositar entre 50-75 huevos por día al comienzo, siendo que luego disminuye. El promedio de vida es de 37 días a 25°C. Si las moscas se separan por sexo durante las primeras 8 horas aproximadamente de vida, las hembras todavía serán vírgenes y podrán emplearse en cruces controladas.

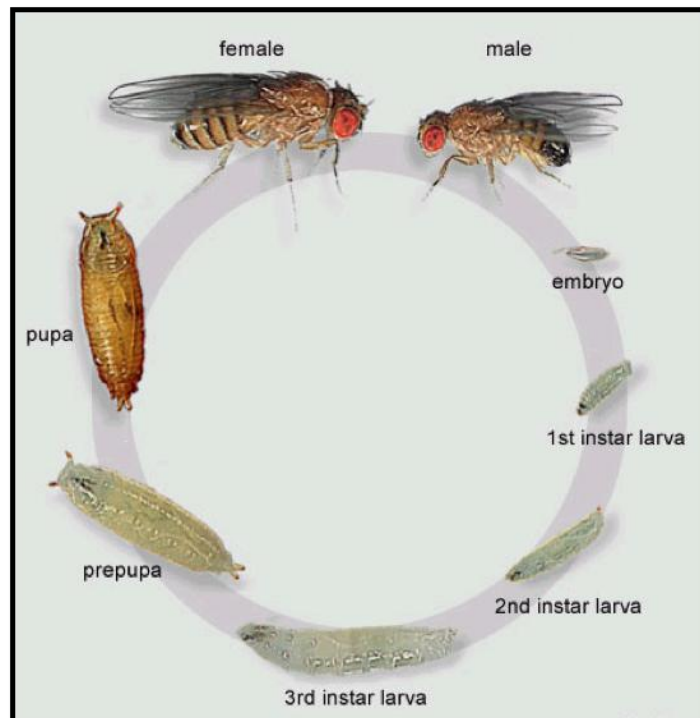


Figura 35. Etapas del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Apariencia de *D. melanogaster* durante el ciclo de vida, desde embrión hasta adulto.

Fuente: sitio web del Laboratorio de Experimentación con *Drosophila* de la UFPE.

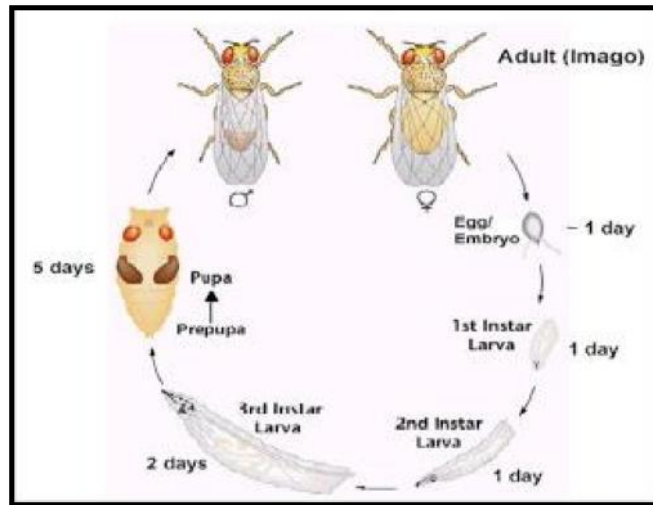


Figura 36. Duración en días de cada etapa del ciclo de vida de *D. melanogaster*.

Fuente: Vargas Héctor, 2007. *La Drosophila melanogaster*.

9.2 ANEXO II: EVALUACIÓN DE EQUIPOS Y REACTIVOS PARA PCR DISPOBILES EN LOS UADE-Labs

Previo al comienzo de nuestro trabajo, se reportaron en el laboratorio algunos ensayos de PCR en los que no se estaban obteniendo amplicones. Por lo tanto se decidió evaluar el funcionamiento de las termocicladoras y los reactivos de PCR disponibles en el laboratorio de biotecnología de UADE-Labs.

9.2.1 EVALUACIÓN DE TRACTIVOS DE PCR EN LA FUNDACIÓN INSTITUTO LELOIR (FIL)

En primera instancia se trabajó en FIL, para evitar cualquier fallo de la cicladora de UADE, y poder comparar los reactivos y polimerasa de UADE con los de FIL. Se utilizó una PCR ya puesta a punto para la detección de una región del gen SPARC en muestras de ADN genómico.

PCR para SPARC

Se utilizó la PCR para la identificación del gen de la proteína SPARC, utilizando DNA y primers de FIL (**Tabla 10**), y se compararon los materiales de UADE y los de FIL, obteniéndose los resultados mostrados en la **Figura 32**.

Tabla 18. Reactivos utilizados en PCR para SPARC

En la tabla se detallan los reactivos utilizados y su correspondiente orden de siembra en la PCR para la detección de SPARC. Detallando en cada caso si se utilizaron reactivos FIL o UADE

PCR	Tubo	Reactivos*	Polimerasa	Molde	Resultado
SPARC (DNA y primers FIL)	1	FIL	FIL	Control (-)	-
	2	FIL	FIL	DNA	Positivo
	3	UADE	UADE	Control (-)	-
	4	UADE	UADE	DNA	-

*Reactivos: Buffer, MgCl₂, dNTPs

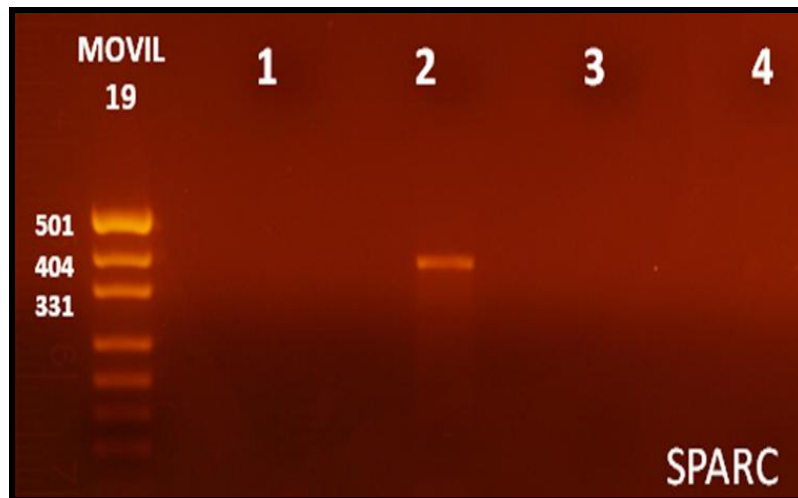


Figura 32. Gel - PCR SPARC. Gel obtenido de la siembra de los productos de la PCR para SPARC. Movil 19 es el ladder utilizado. Lo que fue sembrado en cada calle se detalla en la Tabla 10. Se observa en la calle 4, donde se usaron los reactivos y la polimerasa de UADE, que no hay amplicón.

El tamaño de la banda es el esperado para una de las formas del gen de la proteína SPARC (385pb). En esta reacción se observó que alguno de los materiales de UADE, reactivos o polimerasa, estaba funcionando mal.

PCR para eGFP

Se utilizó la PCR para la identificación de la proteína eGFP, utilizando DNA y primers de UADE y se compararon los reactivos y la polimerasa en forma independiente, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 19. Reactivos utilizados en PCR – eGFP

En la tabla se detallan los reactivos utilizados y su correspondiente orden de siembra en la PCR para la detección de la proteía eGFP. Detallando en cada caso si se utilizaron reactivos FIL o UADE

PCR	Tubo	Reactivos*	Polimerasa	Molde	Resultado
eGFP (DNA y primers UADE)	5	FIL	FIL	Control (-)	-
	6	FIL	FIL	DNA	Positivo
	7	FIL	UADE	DNA	Positivo
	8	UADE	UADE	Control (-)	-
	9	UADE	UADE	DNA	-
	10	UADE	FIL	DNA	-

*Reactivos: Buffer, MgCl₂, dNTPs

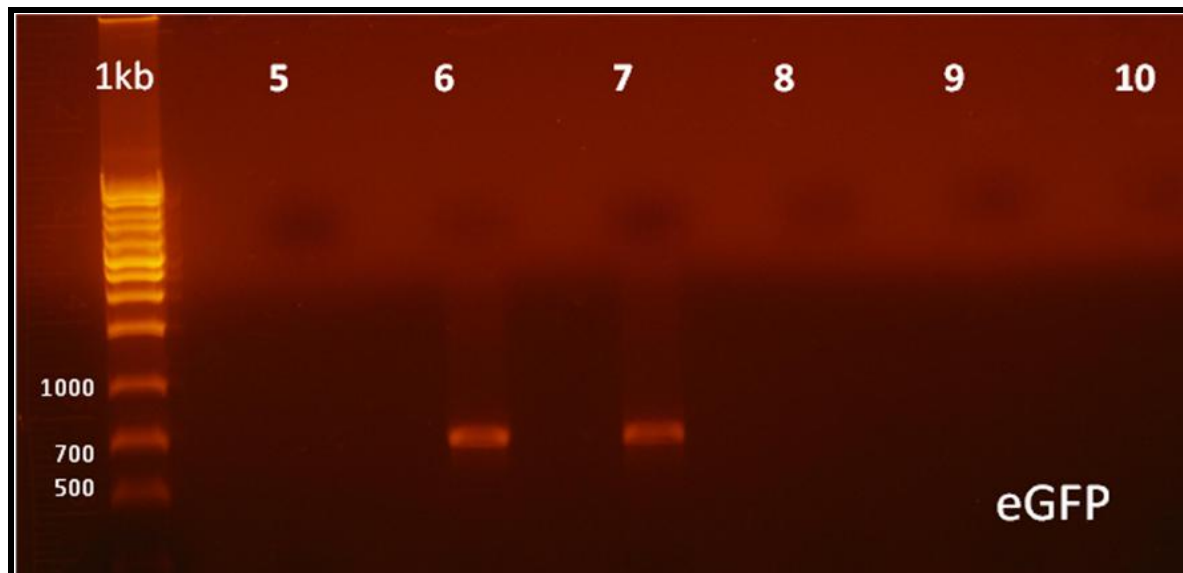


Figura 33. Gel - PCR eGFP. Gel obtenido de la siembra de los productos de la PCR para eGFP. El utilizado fue 1kb. Lo que fue sembrado en cada calle se detalla en la **Tabla 11**.

El tamaño de la banda es el esperado para el gen de la proteína eGFP (720pb). En esta reacción se comprobó que el protocolo para dicha amplificación es el correcto (concentraciones, ciclos y temperaturas) y que la Taq polimerasa de UADE funciona adecuadamente. Se observó que uno o más de los reactivos UADE, Buffer, MgCl₂ o dNTPs están generando problemas en la técnica.

9.2.2 EVALUACIÓN DE REACTIVOS Y TERMOCICLADORAS EN UADE LABS

Con la certeza de que la reacción está bien diseñada y que la enzima funciona correctamente, se procedió a evaluar los reactivos (Buffer, MgCl₂ y dNTPs) y las termocicladoras en UADE Labs (“Techne TC-312” y “Eppendorf Mastercycler”). Se utilizaron Buffer y MgCl₂ nuevos (Genbiotech), y se armó un nuevo stock de mezcla de dNTPs a base de nucleótidos nuevos (Invitrogen). Se eligió la reacción de PCR para identificar eGFP y la enzima previamente testada (Taq Polimerasa de Genbiotech). Se decidió hacer las reacciones por duplicado y también evaluar el stock de dNTPs previo.

Tabla 20. Reactivos utilizados en termocicladora “Techne TC-312” en PCR – eGFP

PCR de eGFP realizada en termocicladora “Techne TC-312”, con el fin de corroborar el buen funcionamiento de la misma, así como también probar los dNTPs ya existentes en UADE Labs y compararlos con nuevos

Cicladora	Calle	dNTPs	Molde	Resultado
Techne TC-312	3	viejos	Control (-)	-
	4	viejos	ADN	-
	6	nuevos	Control (-)	-
	7	nuevos	ADN	-
	9	viejos	Control (-)	-
	10	viejos	ADN	-
	12	nuevos	Control (-)	-
	13	nuevos	ADN	Positivo

Tabla 21. Reactivos utilizados en termocicladora “Eppendorf Mastercycler” en PCR – eGFP

PCR de eGFP realizada en termocicladora “Eppendorf Mastercycler”, con el fin de corroborar el buen funcionamiento de la misma, así como también probar los dNTPs ya existentes en UADE Labs y compararlos con nuevos.

Cicladora	Calle	dNTPs	Molde	Resultado
Eppendorf Mastercycler	3	viejos	Control (-)	-
	4	viejos	ADN	-
	6	nuevos	Control (-)	-
	7	nuevos	ADN	Positivo
	9	viejos	Control (-)	-
	10	viejos	ADN	-
	12	nuevos	Control (-)	-
	13	nuevos	ADN	Positivo



Figura 34. Gel de siembra PCR eGFP en termocicladoras de UADE Labs. Se observa la corrida en gel de agarosa de las PCRs realizadas en las dos termocicladoras de UADE Labs, probando distintos dNTPs. El orden de siembra está descrito en las **Tablas 12 y 13**

La banda que se obtuvo, coincide con el tamaño esperado para la reacción: 720pb. En la calle 7 de las PCR en Techne se esperaba una banda igual a la de la calle 13, que no se amplificó por un error de manipuleo.

No se encontraron evidencias de que las termocicladoras funcionen mal. En cuanto a la polimerasa y los nuevos buffer y MgCl₂, disponibles en UADE Labs, se comprobó, que funcionan adecuadamente, y no deberían generar fallos en un PCR bien puesta a punto. Se observó que el stock previo de dNTPs estaba fallando, y que al hacer una nueva mezcla se obtienen resultados confiables.

9.3 ANEXO III: Protocolos de medios de cultivos

Protocolo para la elaboración de medio de cultivo estándar

Materiales:

- ✓ Agua
- ✓ Sacarosa
- ✓ Polenta común
- ✓ Levadura
- ✓ Agar agar
- ✓ Nipagin (metilparabeno sódico)
- ✓ Ácido propiónico

Preparación:

Poner en una cacerola la sacarosa, la levadura y el agar. Agregar agua y revolver. Cocinar a fuego fuerte revolviendo hasta que hierva. Cuando hierve agregar la polenta y cocinar a fuego bajo durante 8 minutos. Revolviendo para evitar la formación de grumos. Retirar del

fuego y esperar a que esté tibio para agregar el ácido propiónico y el nipagin.

Protocolo elaboración medios para *starving*

Materiales:

- ✓ Agua destilada
- ✓ Agar agar

En un matraz pesar 1 gramo de agarosa, a continuación verter 100 ml de agua destilada dentro del matraz. Mezclar ambos componentes y colocar en microondas, calentando hasta que desaparezca la turbidez. Una vez lograda la completa disolución del agar en el agua, verter el contenido en viales de vidrio.

9.4 ANEXO IV: Supuestos estadísticos para realización de la prueba de t.

Para el análisis de la *prueba de t* se deben cumplir los siguientes supuestos:

- La escala de la variable debe ser al menos de intervalo
- Las muestras deben ser aleatorias y las observaciones independientes
- Las variables deben comportarse normalmente.

Productividad

Para este ensayo, la escala de la variable es de razón, las muestras son aleatorias y las observaciones son independientes.

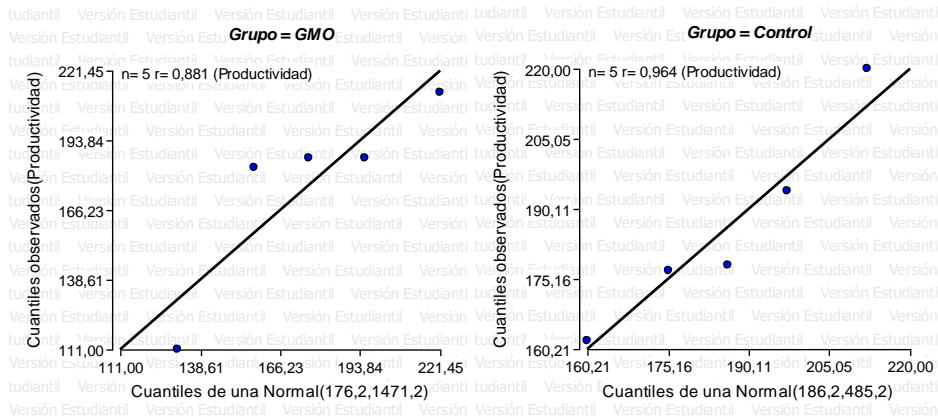
Para analizar la normalidad de las variables, se procede a realizar la prueba de Shapiro-Wilks. En esta prueba estadística, se plantea como hipótesis nula (H_0) que la variable se comporta normalmente. La condición de rechazo de H_0 es que el p-valor obtenido sea menor al nivel de significación (0,05).

Como se puede apreciar en la siguiente tabla, se cumplen los supuestos de normalidad evaluados en esta prueba, debido a que todos los p-valores son mayores a 0,05 y por lo tanto no se rechaza H_0 . Por ende, la evidencia muestral no contradice a la hipótesis nula.

En consecuencia no hay evidencias en contra de que la variable no se distribuya normalmente, en ninguno de los casos.

Grupo	n	Media	D.E.	p-valor
Control	5	186,2	22,03	0,7
OGM	5	176,2	38,36	0,14

En el siguiente gráfico Q-Q plot, se observa que todos los datos se encuentran distribuidos aleatoriamente sobre y por debajo de la recta de tendencia lineal, por lo que no parecería haber problema con el comportamiento normal de la variable.



Gráficos Q-Q

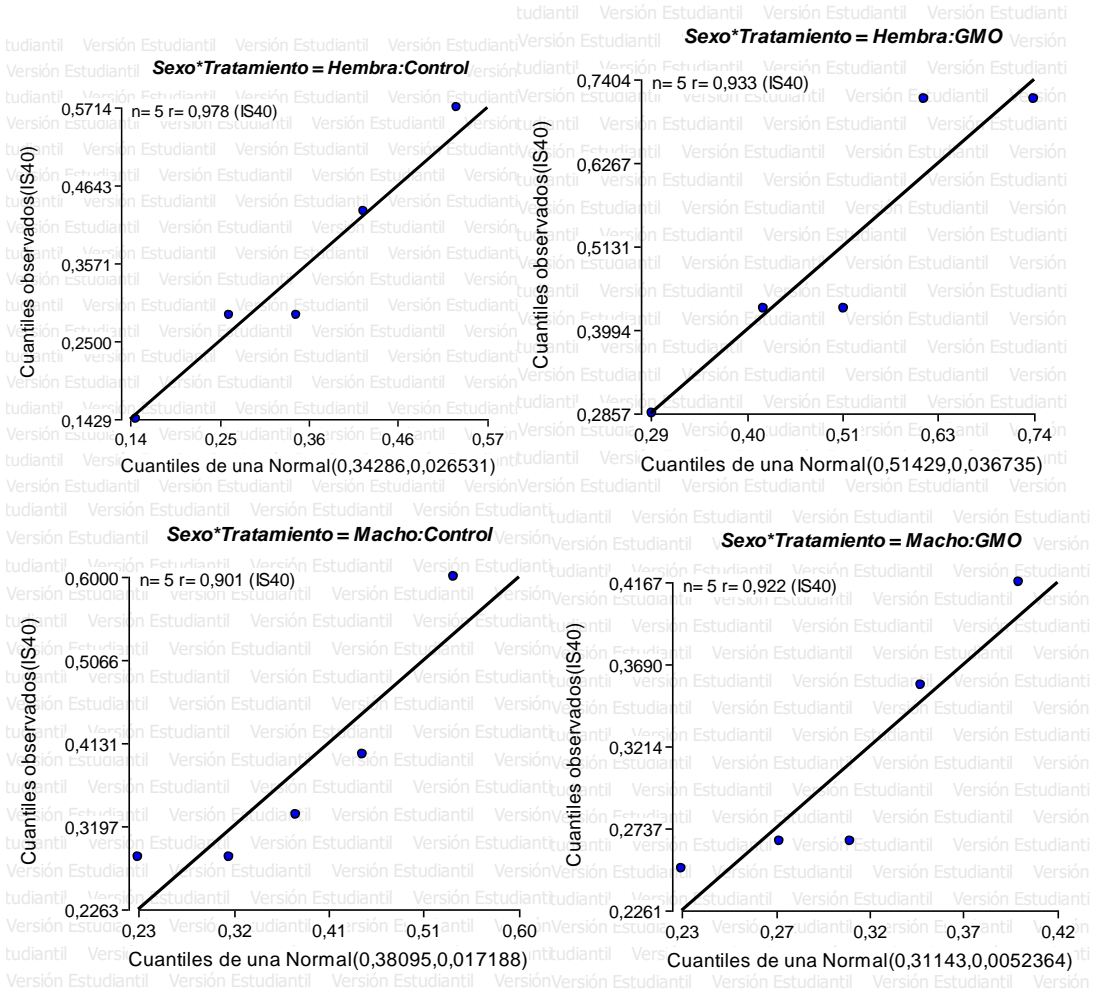
Supervivencia

Para este ensayo, la escala de la variable es de razón, las muestras son aleatorias y las observaciones son independientes.

Para analizar la normalidad de las variables, se procede a realizar la prueba de Shapiro-Wilks. En esta prueba estadística, se plantea como hipótesis nula (H_0) que la variable se comporta normalmente. La condición de rechazo de H_0 es que el p-valor obtenido sea menor al nivel de significación (0,05).

Sexo	Tratamiento	n	Media	D.E.	p-valor
Hembra	Control	5	0,34	0,16	0,82
Hembra	OGM	5	0,51	0,19	0,17
Macho	Control	5	0,38	0,13	0,12
Macho	OGM	5	0,31	0,07	0,16

Como se puede apreciar en la siguiente tabla, se cumplen los supuestos de normalidad evaluados en esta prueba, debido a que dos de los p-valores son mayores a 0,05 y por lo tanto no se rechaza H_0 .



Starving

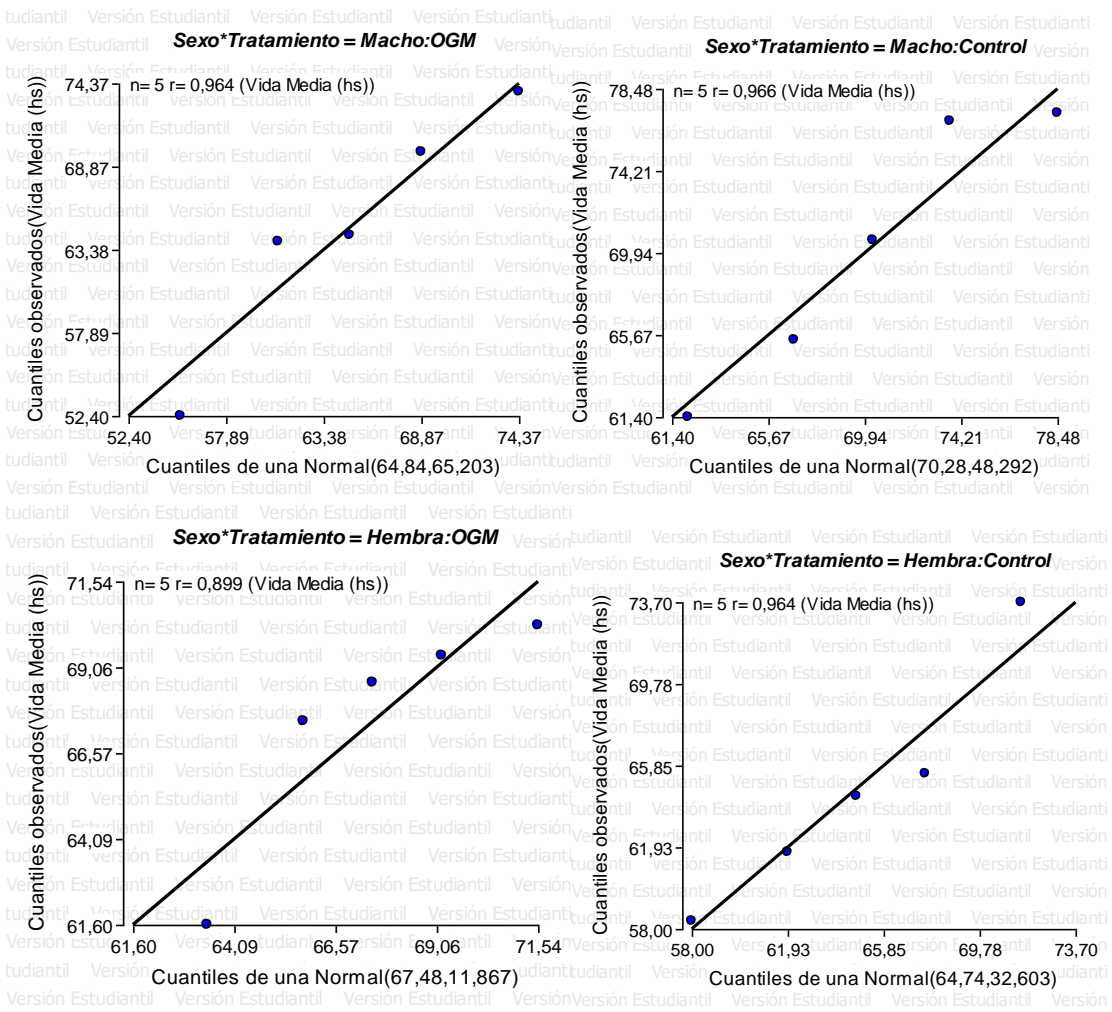
Para este ensayo, la escala de la variable es de razón, las muestras son aleatorias y las observaciones son independientes.

Para analizar la normalidad de las variables, se procede a realizar la prueba de Shapiro-Wilks. En esta prueba estadística, se plantea como hipótesis nula (H_0) que la variable se comporta normalmente. La condición de rechazo de H_0 es que el p-valor obtenido sea menor al nivel de significación (0,05).

Sexo	Tratamiento	n	Media	D.E.	p-valor
Hembra	Control	5	64,74	5,71	0,75
Hembra	OGM	5	67,48	3,44	0,16
Macho	Control	5	70,28	6,95	0,39
Macho	OGM	5	64,84	8,07	0,72

Como se puede apreciar en la tabla, se cumplen los supuestos de normalidad evaluados en esta prueba y por lo tanto no se rechaza H_0 .

En el siguiente gráfico Q-Q plot, se observa que todos los datos se encuentran distribuidos aleatoriamente sobre y por debajo de la recta de tendencia lineal, por lo que no parecería haber problema con el comportamiento normal de la variable.



Gráficos Q-Q plot del índice de vida media

9.5 ANEXO V: PCR para muestras adicionales de maíz

Durante la puesta a punto de la técnica de PCR, se encontró una muestra de granos de maíz orgánico, que presentaba el promotor transgénico (**Figura 35**). Este resultado dará origen a una nueva investigación dentro del marco académico de la fundación UADE.

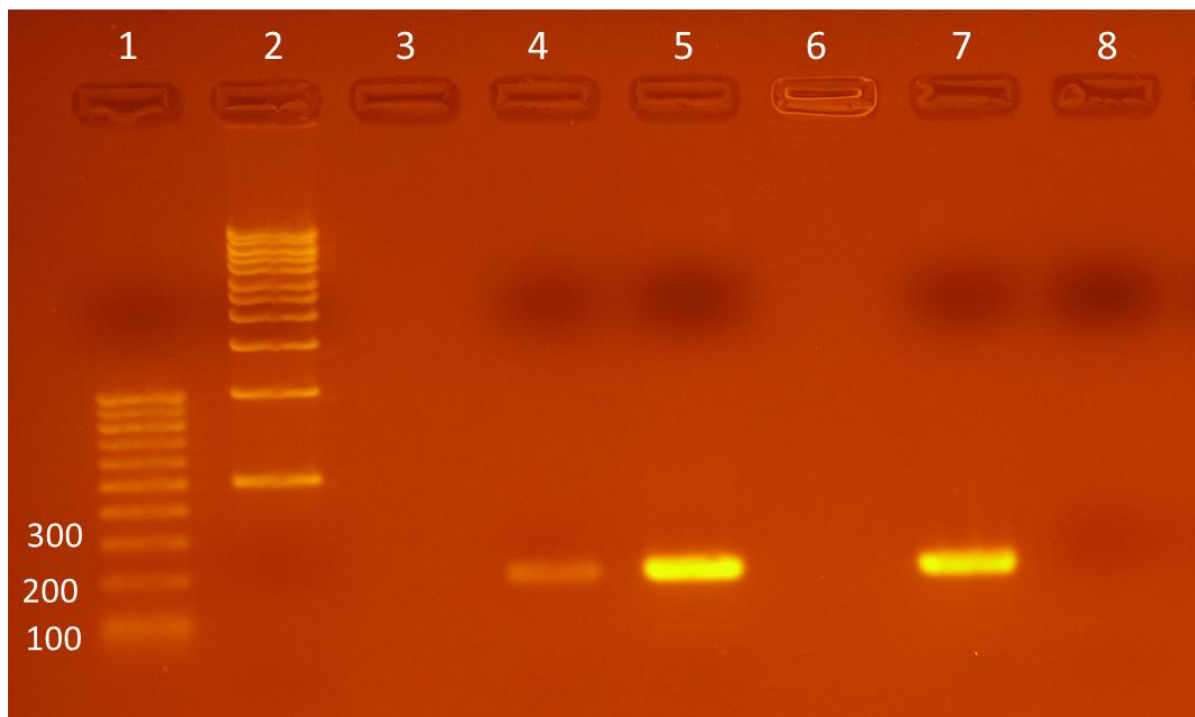


Figura 35. PCR para el promotor CaMV E35S en muestras de maíz. La calle 7 muestra un amplicón para el promotor transgénico en la muestra de ADN genómico de maíz orgánico. Gel de agarosa con siembra de PCR para CAMV 35S. Se describe la siembra en cada calle: 1: Low Mass Ladder, 2: 1Kb Ladder, 4: Control positivo, 5: Maíz GM, 7: Maíz orgánico, 8: Control negativo.