

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA PLAN 2003

TESIS DE GRADO



“Estudio de métodos moleculares para detección de
adulteraciones de Quesos de Cabra con leche de Vaca”

Agustín Miller Araújo

ORIENTADOR Y TUTOR: DR. CLAUDIO MARTÍNEZ DEBAT
LaTraMa SECCIÓN BIOQUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS – Udelar

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
I- Introducción.....	3
I.1.- La matriz de estudio: el Queso de Cabra.....	3
I.1.i.-Definición de Quesos según Reglamento Bromatológico Nacional.....	3
I.1.ii.-Principios Básicos para la elaboración del Queso de Cabra.....	3
I.1.iii.- Posibles fuentes de degradación del ADN durante la manufactura del queso.....	11
I.2.-La problemática de la adulteración.....	12
I.3.-Métodos y técnicas disponibles para evaluación de adulteraciones.....	14
I.3.i-Métodos utilizados en este trabajo.....	15
I.4.- ¿Por qué se utiliza este tipo de ADN?.....	16
I.5.-El método descrito por Bravi	16
I.6.-El método descrito por Matsunaga	19
II-OBJETIVOS.....	20
III-MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
III.1.-Extracción de ADN para quesos.....	22
III.2.-Extracción de ADN para Controles.....	22
III.3.-Medición de los ADN extraídos.....	23
III.4.-Estudio de detección de ADN de Vaca en mezcla de ADNs utilizados para el método Bravi.....	24
III.5.-Estudio de detección de ADN de vaca en mezcla de ADNs y muestras de Quesos para el método Matsunaga.....	26
IV-RESULTADOS.....	28
IV.1.- Medida de concentración de ADNs extraídos de las muestras de quesos.....	28
IV.2.-Estudio del desempeño del método RFLP para detección de especies (Mét.Bravi).....	29
IV.3.-Estudio de detección de especies mediante cebadores reversos específicos. (Mét.Matsunaga).....	30
IV.4.-Detección de la presencia de especies no declaradas en quesos de cabra mediante el uso de cebadores reversos específicos.....	31
V-DISCUSIÓN.....	33
VI-CONCLUSIONES.....	35
VII-PERSPECTIVAS.....	36
VIII-Bibliografía.....	39

ABREVIATURAS

AcOK Acetato de Potasio

ADNmt ADN mitocondrial

CYTB Citocromo b

dNTP Desoxi Nucleotido Tri-Fosfato

EDTA Acrónimo del inglés Ácido EtilenDiaminoTetraacético (ligando_hexadentado

ELISA Acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

EtOH Etanol

M.P.M Marcador de Peso Molecular

MgCl₂ Cloruro de Magnesio

NaCl Cloruro de Sodio

NCBI National Center for Biotechnology Information

ng Nano gramos

pb Pares de bases

PCR Acrónimo del inglés *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PCR-TR Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real

RFLP Acrónimo del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción)

SDS Acrónimo del inglés Sodium Dodecyl Sulfate (dodecilsulfato sódico)

Tris HCl Clorhidrato de Tris(hidroximetil)aminometano

RESUMEN

Los quesos de Cabra son un producto codiciado por personas que gustan de su textura y sabor, por otras que son alérgicas a productos lácteos provenientes de otras especies, y también personas que los prefieren por un tema religioso.

Teniendo en cuenta esta realidad, y pensando en la defensa del consumidor ante posibles adulteraciones de los productos, y también en defensa de las empresas que pueden llegar a verse perjudicadas mediante la práctica de la competencia desleal, estudiamos el alcance de dos técnicas moleculares basados en la amplificación mediante PCR de secuencias del gen del citocromo b (CYTB) para la detección de adulteraciones de quesos de Cabra con leche de Vaca.

Originalmente estos métodos han sido descritos para el análisis forense de restos animales (Bravi et al., 2004), o utilizados en el análisis de mezclas alimentarias derivadas de mamíferos superiores (Matsunaga et al., 1999). El primero de estos métodos se basa en un polimorfismo de tamaños de fragmentos de restricción a partir de la amplificación de una región común para todas las especies, el segundo en patrones de bandas diferenciales productos de una *PCR multiplex* con un cebador directo universal y cebadores reversos específicos para cada especie.

Este estudio arrojó como resultado que el método de Matsunaga puede detectar a partir de un 5% de ADN de vaca en un fondo de ADN de cabra, y el método Bravi lo hace a partir del 30%. Asimismo pusimos a punto un método novedoso de extracción de ADN a partir de muestras reales de quesos de cabra y analizamos su composición especie-específica. El método de Matsunaga se demuestra como adecuado para el análisis de adulteraciones y/o contaminaciones de quesos de cabra con leche de vaca.

I-INTRODUCCIÓN

I.1.- La matriz de estudio: el Queso de Cabra.

I.1.i.-Definición de Quesos según Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto Nº315/994: Con el nombre genérico de queso se entiende el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de leche o de leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario.

I.1.ii.-Principios básicos para la elaboración del Queso de Cabra

La información que aquí se presenta fue extraída y modificada del portal <http://www.capraispana.com>. Asimismo, para tener una visión de cómo se produce el queso de cabra a nivel local recurrimos a la información proporcionada por el Dr. Hugo Asti en representación del establecimiento caprino La Margarita que comercializa en el Uruguay la marca de productos lácteos *Caprino Alto*.

Se expondrán los pasos generales en la fabricación de quesos, ya que existen quesos que sufren procesos más o menos diferentes para lograr ciertas texturas y sabores.

La elaboración del queso de cabra es muy similar a la de quesos de vaca, este proceso requiere de tres pasos. El primer paso en la elaboración del queso es la obtención del *coágulo* o *el cuajado de la leche*, el segundo paso consiste en *el desuerado* del mismo (que se refiere a la pérdida de

parte del suero contenido en la leche) y el tercero corresponde al proceso microbiano por el cual se transforma la cuajada, denominado *maduración*. A continuación pasaremos a detallar brevemente dichos pasos.

Cabe destacar aquí que en nuestro país los quesos de cabra se realizan (en mayor parte) en base a leche de cabra pasteurizada, los quesos hechos en base a leche cruda deben tener una maduración de por lo menos tres meses de estacionamiento, para asegurarse la eliminación de alguna eventual carga bacteriana nociva (más que nada coliformes), que pudiera llegar a tener (Dr. Hugo Asti, 2011, com. pers.).

Para el caso de los quesos producidos en la empresa *Caprino Alto* (y mayoritariamente en todos los establecimientos del ramo de nuestro país), luego del ordeño de las cabras, la leche se refrigera a 4°C y posteriormente se pasteuriza (a 65°C durante 20 minutos) y luego se enfría rápidamente (Dr. Hugo Asti, 2011, com. pers.).

Coagulación de la leche

Mediante el cuajado se realiza un proceso de solidificación y precipitación de las proteínas que se encuentran disueltas en la leche (principalmente caseínas), las que se agrupan formando una especie de entramado semi-sólido a modo de esponja que retiene el suero líquido (<http://www.capraispana.com>).

Este proceso de solidificación se obtiene por medio de dos mecanismos diferentes. El primero es la fermentación láctica, proceso natural de acidificación del medio producido por las bacterias lácticas, cuyo producto de fermentación (el ácido láctico) hace disminuir el pH de la leche hasta pH 4.6, valor en que la leche coagula y precipita. Este tipo de proceso es utilizado en la fabricación de quesos denominados de pasta blanda, debido a las frágiles y poco cohesionadas características de la cuajada (<http://www.capraispana.com>).

El segundo método que se utiliza es la coagulación por medio del *cuajo* que es una sustancia presente en el abomaso de los mamíferos rumiantes jóvenes que todavía se alimentan a base de leche (pudiendo ser extraída de cabritos, terneros, corderos u otros rumiantes). También existen cuajos de tipo vegetal que se extraen de plantas, y de origen microbiano. En el cuajo se encuentran presentes dos enzimas responsables de la acción del mismo, estas son la *pepsina* y *quimosina* siendo la proporción de quimosina, y la calidad del cuajo, mayor cuanto más joven es el animal. Estas enzimas realizan la tarea de cortar la cadena polipeptídica de la caseína, cuyos residuos actúan formando una red que retiene la mayor parte de los sólidos lácteos, glóbulos de grasa, minerales y suero (<http://www.capraispana.com>).

En el Uruguay generalmente se realiza una cuajada mixta. La leche de cabra al sufrir el proceso de pasteurización elimina los gérmenes que son nocivos para la salud, pero también parte de la flora bacteriana responsable de la fermentación láctica necesaria para la coagulación láctica. Por este motivo mientras se baja la temperatura (pasados los 20 min a 65°C de la pasteurización), y mientras la leche se encuentra en un rango entre 30 y 40 °C, se le incorporan fermentos lácticos liofilizados para restaurar la flora bacteriana que se perdió. Posteriormente se le agrega el cuajo que no proviene de orígenes animales ni vegetales sino que se trata de un cuajo recombinante biosintetizado, que sumado a la fermentación láctica forma la cuajada (Dr. Hugo Asti, 2011, com. pers.). Por lo tanto, las posibles fuentes exógenas de ADN en el queso de cabra creados bajo esta modalidad es de esperar que sea sólo de origen bacteriano.

El paso que le sigue a la coagulación se denomina desuerado

EL desuerado es el escurrimiento del suero que se formó en la coagulación, este paso termina de definir la consistencia final que tendrá el producto (la cual fue en parte predestinada por el tipo de coagulación empleada). A este proceso lo afecta: la temperatura la cual se recomienda que sea constante en todo el proceso, la acidez puesto que el aumento de la misma da lugar a una masa poco cohesionada la cual hace más difícil la acción de “volteado” del cuajo, cuyo objetivo sería similar al el girar sobre sus caras una esponja cargada de liquido sobre una superficie sólida, para que por acción de la gravedad se favorezca la pérdida de dicho líquido (<http://www.capraispana.com>).

Maduración del queso

Se da en todos los quesos a excepción de aquellos que están destinados a consumirse frescos. En esta etapa se definen las propiedades organolépticas del producto.

En esta la lactosa es transformada por medio de las bacterias fermentadoras presentes en el cuajo a ácido láctico, el cual ayuda a lograr una consistencia blanda.

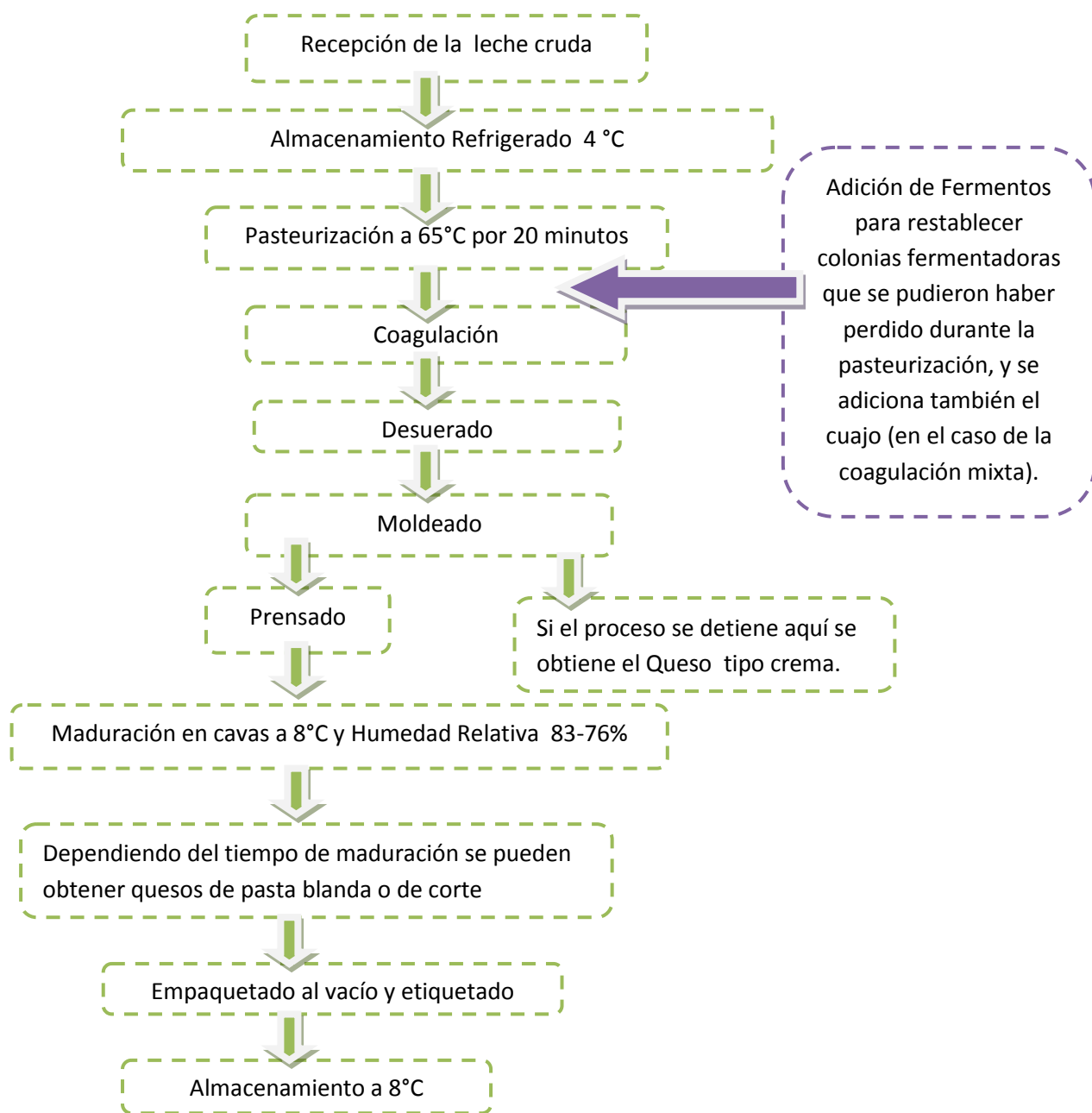
Junto con la lactosa, existe otro factor que influye sobre la consistencia aroma y sabor del producto, este se ve enormemente afectado en esta etapa: dicho factor es la ya mencionada *caseína*. Esta proteína es degradada por proteólisis por una serie de enzimas microbianas ayudando al proceso de maduración, sin embargo la acción de estas enzimas se ve disminuida en medios con bajos pH, para evitar esto se suele recurrir al empleo de levaduras y mohos tipo *Penicillium (candidum, album o glaucum)*, los cuales consumen ácido láctico disminuyendo la acidez; o esparciendo por la superficie carbón vegetal (que contiene potasio) que neutraliza la misma (<http://www.capraispana.com>).

Otro factor que afecta la maduración es la grasa presente en la leche. Se observa que en quesos que se utilizó leche descremada (ejemplo: quesos magros), la etapa de maduración se lleva a cabo más rápidamente. A su vez la presencia de grasa puede dar lugar a el desarrollo de microorganismos putrefactores no deseados, que afectan a la calidad del queso y podrían afectar la salud de los consumidores.

Sumado a estos factores se cuida la temperatura de maduración, ya que las colonias bacterianas que actúan tienen temperaturas óptimas de crecimiento, la humedad del ambiente y la ventilación los cuales son factores tomados en cuenta para evitar olores indeseables en el producto. Comúnmente, también se suele realizar un salado, el cual forma una costra desecada para evitar un crecimiento bacteriano no deseado (<http://www.capraispana.com>).

Dependiendo del tiempo que se deje el queso madurar se obtendrán distintas texturas y cuerpos, por ejemplo quesos que se envasan sin prensar dan lugar a los quesos untables, quesos que se dejan madurar poco tiempo (semanas) se obtienen quesos de pasta blanda, en cambio si se dejan madurar por encima de los tres meses se logran los quesos denominados de corte que son de consistencia más dura (Dr. Hugo Asti, 2011, com. pers.).

Como explicación general del proceso de producción de queso de cabra, en el esquema 1 se resume el proceso de manufactura, y se incluyen fotos del establecimiento caprino "LA MARGARITA", y de las instalaciones de la quesería para ilustrar aun más el proceso.



Esquema.1. Pasos que usualmente son utilizados para la manufactura del queso.



Fotos 1. Cabrerizas del establecimiento caprino La Margarita. Gentileza del Dr. Hugo Asti.



Fotos 2. Instalaciones de la quesería del establecimiento caprino La Margarita. Gentileza del Dr. Hugo Asti.

I.1.iii.- Posibles fuentes de degradación del ADN durante la manufactura del queso

La extracción de ADN se realiza a partir de células somáticas presentes en la leche, existe bibliografía donde se documenta que existen suficientes células somáticas en la leche de mamíferos (que mucha de ellas se encuentran aún presentes en el queso), de donde se puede extraer ADN de adecuada cantidad y calidad para realizar estudios de detección mediante PCR (Herman, 2001), pero dicha cantidad es muy inferior a la que se obtendría de carne fresca o sangre. En este sentido Rea (Rea et al., 2001) reportó que la cantidad y calidad de ADN recuperable en quesos y leche se encuentra directamente relacionado al contenido de células somáticas de la leche cruda y a la fuerza de la técnica utilizada para procesar el producto. López-Calleja (López-Calleja et al., 2005) analizó muestras de leche pura (%100) de vaca incluyendo cruda, pasteurizada y esterilizada y descubrió que el tratamiento térmico disminuyó a la mitad el número de células somáticas pero a pesar de ello, la reacción de PCR no se vio afectada, demostrando que se pudo extraer ADN amplificable.

La manufactura del queso presenta pasos en los cuales la cantidad y calidad del ADN podría verse comprometida, debido a que en ciertas etapas del proceso se requiere de altas temperaturas (ej. en la pasteurización de la leche), la utilización de microorganismos y tratamientos químicos (ej. durante el cuajado y la maduración).

I.2.-La problemática de la adulteración

El garantizar la calidad de un producto es actualmente un requisito importante para el consumidor, y que exige autentificar el origen y la calidad del alimento, ya sea debido a cuestiones de salud, como por ejemplo intolerancia a ciertos componentes del mismo, tendencias a desarrollar reacciones alérgicas, o por cuestiones religiosas en las cuales se prohíbe el consumo de alimentos provenientes de determinadas especies (p. ej. cerdo o vaca). A su vez se trata de una problemática que no sólo afecta a los consumidores, sino también al sector productivo, ya que la adulteración de productos genera competencia desleal (Meyer, Hofelein, Luthy, & Candrian, 1995).

La adulteración de quesos de cabra con leche de vaca puede traer aparejados problemas de salud ya que hay personas a las cuales se le recomienda el consumo de dichos productos lácteos, debido a que por su composición, son más fáciles de digerir que los productos derivados de leche de vaca; esto se debe a que en la leche de cabra se encuentran presentes en mayores cantidades los ácidos grasos Cáprico (C10:0), Caprílico (C8:0), entre otros (Jenness, 1980), y triglicéridos de cadena media (MCT) los cuales son conocidos por ser beneficiosos para la salud estos ácidos grasos se han establecido como parte de tratamientos médicos para una variedad de desordenes y condiciones clínicas, que incluyen alimentación de niños prematuros, síndromes de mala absorción, fibrosis quística, hiperlipoproteinemia, personas con by-pass coronarios y problemas cardiovasculares (Haenglein et al., 2004), ya que poseen la cualidad única de proveer energía directamente sin tener que ser almacenados en el tejido adiposo, también ayudan a bajar la cantidad de colesterol en sangre inhibiendo y limitando la deposición del mismo (Alferez et al., 2001).

Además la leche de vaca contiene aproximadamente 20 proteínas que son causantes de alergias, que afectan mayoritariamente pero no exclusivamente a infantes, fracciones de caseína (mayoritariamente la α -s-1 caseína) y β lactoglobulina son las proteínas mas alergénicas de la leche de vaca. La leche de cabra posee, β -caseína, que es similar a la caseína presente en la leche humana y diferente a la de vaca, y también posee la α -2s-caseína que es menos alérgica que la α -s-1-caseína presente en la leche de vaca (Haenlein et al., 2004). Si bien estos estudios demuestran que la utilización de leche de cabra para personas que sufren de intolerancia a la leche de vaca, existen otros que demuestran que esto no es tan así, en estos estudios se evidencia que las IgEs (Inmunoglobulina de tipo E) extraídas del suero de niños alérgicos a la leche de vaca, son capaces de reconocer muchas regiones de proteínas provenientes de leche de mamíferos como ovejas, búfalos y cabras. (Orlando and Breton-Bouveyron, 2000); (Alvarez and Lombardero, 2002); (Muraro et al., 2002); (Restani et al., 2002); (Pessler and Nejeat, 2004).

De cualquier manera, asegurar la calidad de estos productos a las personas que se benefician con los mismos, opera a favor de su salud, y de la confianza de éstos a los productores.

Existen también personas que no pueden consumir productos derivados del ganado vacuno debido a reglas religiosas (por ej: hindúes), que se verían sometidos a enfrentar una problemática de carácter religioso al consumir productos caprinos adulterados, o contaminados con leche vacuna.

Sumado a estos efectos en los que la adulteración impacta, el fraude económico es el efecto más evidente de todos, debido a que el alto precio de la leche de Cabra y las grandes variabilidades en el rendimiento de la producción estacional, harían difícil la competencia entre productores que utilizan leche pura de Cabra para realizar sus quesos, de los que no, ya que luego se comercializarían productos a un precio probablemente igual a los de mayor calidad generando una competencia desleal entre productores (Maudet and Taberlet, 2001).

I.3.-Métodos y técnicas disponibles para la evaluación de adulteraciones

En cuanto a los métodos utilizados para evaluar las adulteraciones, se han desarrollado diversas técnicas analíticas y moleculares, para la identificación de los componentes de diversas matrices alimentarias. Las técnicas analíticas más utilizadas incluyen: cromatografías como por ejemplo HPLC (Pellegrino et al., 1992), la utilización de electroforesis capilar para rastrear la β -lactoglobulina (Cartoni et al., 1998).

En contraste, las técnicas moleculares basadas en el estudio de ADN y proteínas parecen ser más versátiles, permitiendo la identificación de especies en distintas matrices alimentarias, que incluyen productos crudos, congelados y procesados. Originalmente estos métodos se basaban en el análisis de las proteínas presentes (Marmioli et al., 2003) mediante técnicas electroforéticas y/o inmunológicas como por ejemplo la detección de la β -caseína bovina en la leche mediante el método de ELISA descrito por Richter (Richter et al., 1997), Western blot, entre otros. El método utilizado como referencia en la actualidad para detectar la presencia de leche de vaca en la Comunidad Europea se basa en el isoelectroenfoco (IEF) de la β -caseína (Commission Regulation, 1996). Si bien el uso de estas técnicas se encuentran ampliamente difundidas, éstas a veces resultan difíciles de aplicar para alimentos procesados, debido a que las proteínas mediante los procesos de manufactura tales como la cocción, pueden desnaturalizarse y degradarse, dando lugar a resultados del tipo "falsos positivos" debido a la similitud que existen en ciertas proteínas entre especies distintas que pueden verse agravados por el proceso de manufactura, o "falsos negativos" que pueden darse por la pérdida de epítopes. En cambio el ADN puede extraerse de la casi totalidad de los tejidos y permanece prácticamente inalterado a través de todo el proceso de manufactura, desde el organismo vivo a la porción de producto que se consume. Aunque el ADN también se degrada durante la esterilización por calor como por ejemplo en el proceso de enlatado de alimentos, todavía es posible obtener pequeños fragmentos que hacen

posible la diferenciación entre especies cercanas (Ram, 1996), (Ebbehoj, 1991), (Chikuni, 1990).

Por lo anteriormente mencionado, la identificación basada en el ADN constituye la herramienta de elección para realizar la identificación de especies en un alimento dado.

I.3.i-Métodos utilizados en este trabajo

Basándonos en lo dicho anteriormente, hemos estudiado el desempeño de dos métodos moleculares propuestos por dos grupos de estudio para la identificación de ciertas especies animales, mediante el análisis del ADN remanente en muestras complejas , como es el caso del método descrito por Bravi (Bravi et al., 2004) que trata muestras forenses (restos de animales, huesos, vísceras o piel), y el método descrito por Matsunaga (Matsunaga et al., 1999) que trata productos alimenticios que han sufrido cierto proceso de cocción. En este trabajo comparamos el desempeño y la reproducibilidad de ambos métodos, a la hora de identificar las especies presentes en mezclas de ADN en concentraciones exactamente conocidas, y con el objetivo final de evaluar la especificidad de los métodos aplicados a la matriz quesos (específicamente de cabra) y el umbral de concentraciones a los cuales es posible detectar la presencia de ADN foráneo en la mencionada matriz.

Ambos Métodos comparten pasos muy importantes:

- 1) La utilización de la técnica de PCR, técnica que se basa en la amplificación de uno o varios fragmentos de ADN de manera exponencial, de manera que luego de determinados ciclos de reacción se cuente con una gran cantidad de fragmentos de ADN (Saiki, 1985).
- 2) La amplificación ADN mitocondrial, más específicamente los cebadores utilizados en ambas buscan amplificar fragmentos de ADN que corresponden a la secuencia del gen *CYTB*.

I.4.- ¿Por qué se utiliza ADN mitocondrial?

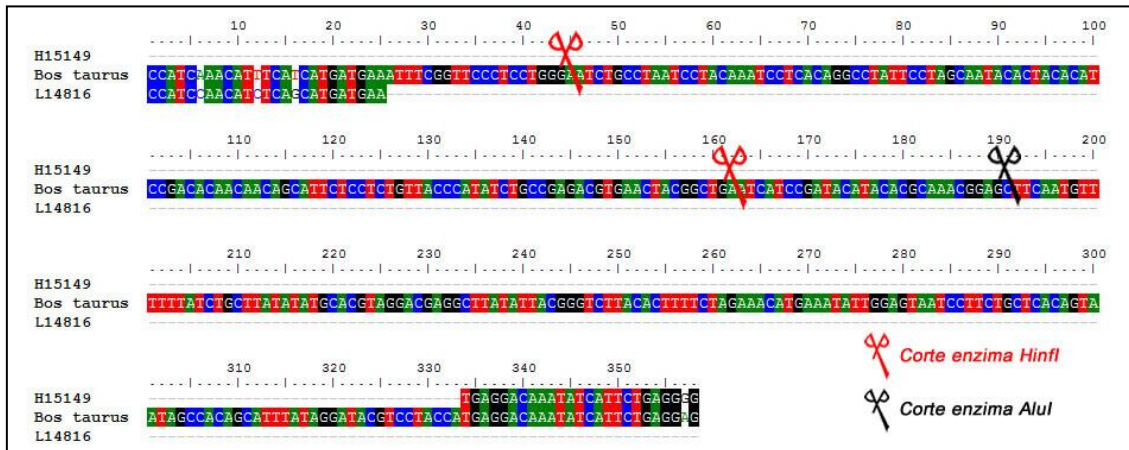
Este tipo de ADN posee varias características que lo hacen muy útil a la hora de realizar estudios filogenéticos y de identificación de especies. Los genes de ADN mitocondrial (ADNmt) exhiben una tasa de mutación más alta que los ADNs nucleares (Pesole, 1999) y son transmitidos por línea materna como un bloque haploide de genes completos. Además se encuentran presentes varios cientos o miles de copias de ADNmt en cada célula (Robin, 1988). Esto es importante a la hora de estudiar muestras con cierta antigüedad o en nuestro caso en muestras que han sufrido cierto proceso de cocción en el cual el ADN se fragmenta y degrada.

I.5.-El método descrito por Bravi (Bravi et al., 2004).

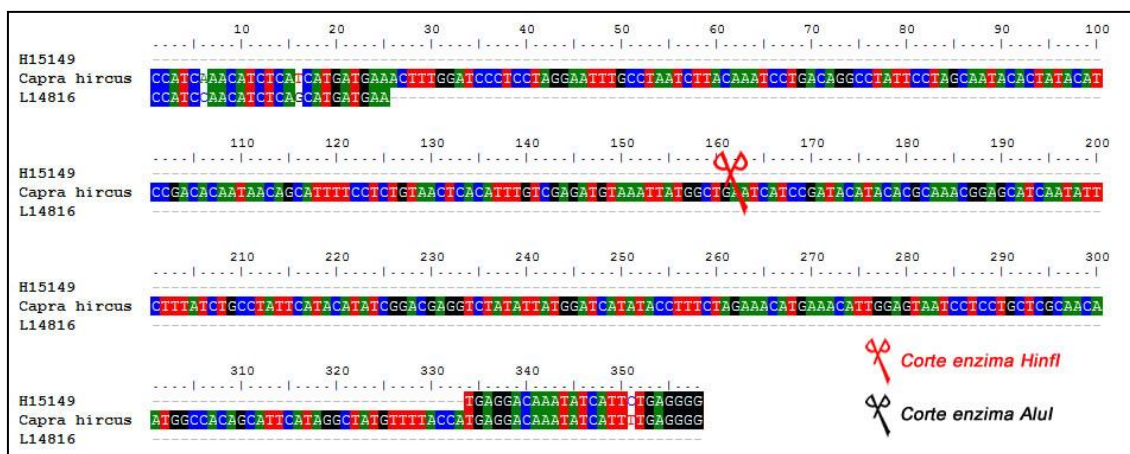
Es un método basado en parte en el método descrito por Kocher (Kocher et al., 1989), este método se basa en el uso de cebadores universales, diseñados para amplificar mediante PCR, un fragmento conservado de ADN de 358 pb del gen mitocondrial CYTB de cualquier especie presente en la muestra, y que al digerirlo posteriormente con enzimas de restricción se observa un patrón de bandas de diferentes tamaños, que son propias de cada especie presente (PCR-RFLP).

Las enzimas utilizadas son *AluI* e *HinfI* que reconocen y cortan en las secuencias 5'-AG/CT-3' y 5'-G/ATTC-3' respectivamente. El fragmento de ADN de Cabra amplificado mediante los cebadores universales, posee un solo sitio de corte para la enzima *HinfI*, a los 162 pb desde el extremo 5' dando lugar a dos fragmentos de 162 y 196 pb. Dicho fragmento no posee sitio de corte para la enzima *AluI* por lo cual al correr el gel de dicha digestión, se verá una banda de 358 pb sin digerir (Fig. 1a).

a



b



c

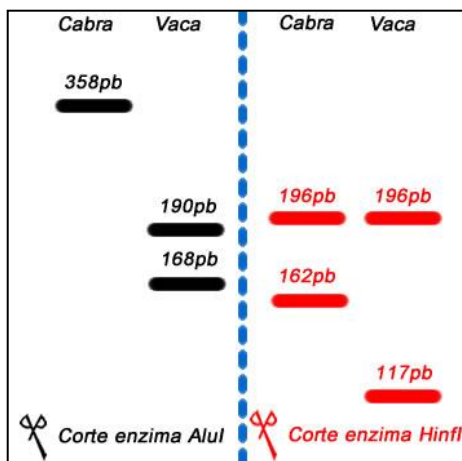


Figura.1 a). Secuencia de 358 pb del gen mitocondrial perteneciente al CYTB de Vaca (*Bos taurus*), amplificado mediante cebadores universales, en los que se marcan sitios de restricción para las enzimas HinfI y AluI. **b).** Secuencia de 358pb del gen mitocondrial perteneciente al CYTB de Cabra (*Capra hircus*), amplificado mediante cebadores universales, en los que se marca el único sitio de restricción que esta presenta para la enzima HinfI. **c).** esquema grafico de los patrones de bandas que se verían en un gel luego del corte de las enzimas.

A su vez el fragmento de ADN de Vaca amplificado mediante los mismos cebadores, posee dos sitios de corte para la enzima *HinfI* a los 44 y 161 pb dando lugar a tres fragmentos, de 44, 117, y 196 pb, (Fig. 1b) el fragmento de 44 pb no se verá en el gel debido a que, por su pequeño tamaño migra completamente en el gel de poliacrilamida 6% que utilizaremos.

En resumen, en muestras de quesos de Cabra adulterados o que hayan sido declarados como mezcla de Cabra, luego de digerido el fragmento de 358 pb con las enzima *AluI* se deberán ver tres bandas, la de 358 pb sin digerir perteneciente al fragmento de ADN de Cabra, y las de 190 y 168 pb correspondientes a la digestión del fragmento de ADN amplificado de Vaca, las cuales nos permitirán reconocer la presencia o no de adulteraciones.

Para la digestión del fragmento amplificado con *HinfI* se deberían ver tres bandas, una de 196 pb que no sirve para discriminar una especie u otra (ya que es común a ambas), la siguiente de 162 pb que corresponde a la presencia de ADN de Cabra, y una de 117 pb que corresponde a la presencia de ADN de Vaca, siendo estas dos últimas las que nos ayudaran a reconocer la presencia o no de adulteraciones. En la Fig. 2 se resume gráficamente las bandas presentes en cada una de las digestiones dependiendo las especies presentes. Si bien las secuencias de unión a los cebadores y los sitios de corte fueron descritos en los respectivos trabajos por sus autores, buscamos las secuencias en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para corroborar dichos datos, de allí bajamos la secuencia mitocondrial para Vaca (*Bos taurus* NCBI Reference Sequence: NC 006853.1), y la de Cabra (*Capra hircus* NCBI Reference Sequence: NC 005044.2) y en cuanto al análisis de los sitios de corte se utilizó el programa *web cutter* 2.0 disponible en la red de redes (<http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/>).

I.6.-El método descrito por Matsunaga (Matsunaga et al., 1999).

Se basa en el uso de un cebador directo universal para todas las especies y cebadores reversos específicos para cada especie, dando lugar a amplicones de distinta longitud y por ende peso molecular, los cuales nos ayudarán a discriminar la presencia de dichas especies.

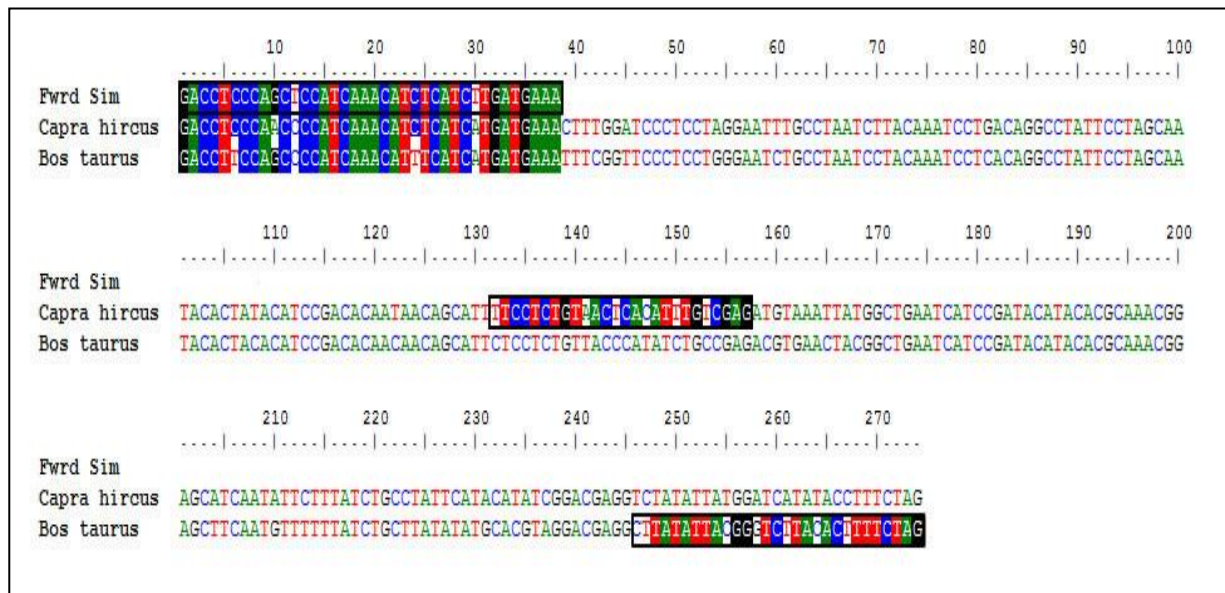


Figura.2. Sitios de unión del cebador universal Fsim y los cebadores específicos en las secuencias de ADNmt del gen CYTB, para Cabra (*Capra hircus*), como para Vaca (*Bos Taurus*), las bases sin relleno muestran las diferencias entre el cebador y las secuencias.

En La figura 2 se observan los alineamientos de las secuencias de CYTB para las especies Cabra y Vaca obtenidas del NCBI, junto con las posiciones en las cuales se unirían los cebadores F-Sim y los reversos de cabra y vaca evidenciando las diferencias en las secuencias y en los tamaños que tendrían los productos de PCR.

II-OBJETIVOS

Objetivo General

Se plantea la implementación de herramientas moleculares, para estudiar la adulteración de quesos de cabra con leche de vaca. Este tipo de estudios cuenta con el interés del laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo.

Objetivos Específicos

En este estudio nos planteamos evaluar:

- 1) El desempeño de dos herramientas moleculares, para la detección cualitativa de ADN de vaca en mezclas con ADN de cabra, y su posible implementación a la hora de estudiar muestras de quesos.
- 2) El desempeño de un nuevo método para extracción de ADN de muestras alimenticias complejas.

A modo de perspectiva se realizara el diseño de cebadores específicos para las especies de Cabra y Vaca a partir de los cebadores propuestos por Matsunaga para ser utilizados en un futuro en la implementación de la técnica cuantitativa PCR en Tiempo Real.

III-MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.-Extracción de ADN para quesos

Las muestras de queso fueron provistas (codificadas) por el Laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo.

La extracción de ADN de las muestras de queso, se realizó mediante un método de extracción rápido y eficaz, desarrollado y puesto a punto por nuestro grupo, y utilizado rutinariamente en nuestro laboratorio. El mismo está basado a su vez en un método para extracción de ADN de una matriz vegetal (Dellaporta et al., 1983). A dicho procedimiento se le agrega un paso de Proteinasa K para degradar las proteínas presentes en la matriz, y luego un paso de desproteinización con cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) para extraer las proteínas degradadas presentes.

Procedimiento

Se pesaron 250 mg de muestra, se agregó 1000 µl de Buffer de Extracción (Tris-HCL 50mM pH 8, EDTA 10mM pH 8, NaCl 100mM, SDS 1%, beta mercaptoetanol 10mM), se mezcló bien por inversión varias veces, luego se agregó 10 µl de Proteinasa K (10 mg/mL), y se incubó a 65°C, 30 minutos agitando cada 5 minutos.

Se realizó una desproteinización con 500 µl de Cloroformo:Alcohol isoamilico (24:1) mezclando por inversión enérgica durante 5 minutos, y posteriormente se centrifugó 5 minutos a 12 krpm, y se tomó la fase acuosa (superior), a la que se agregaron 300 µl de AcOK 5M invirtiendo el tubo 5 veces, para luego incubar en hielo 10 minutos. A continuación se centrifugó a 12krpm durante 20 minutos, se tomó 1ml de sobrenadante y se transfirieron a otro tubo, al cual se adicionó 1ml de isopropanol se invirtió el tubo 10 veces para luego centrifugar 15 minutos a 12 krpm descartando el sobrenadante con cuidado, lavando el *precipitado* con 400 µl de EtOH 70%. Se centrifugó 5 minutos a 12 krpm, se descartó el

sobrenadante y se secó en vacuo secador rotatorio (*Speed Vac SC100 Savant with a Refrigerated Condensation Trap RT100 Savant*). Se resuspendió el ADN en 100 µl de agua mQ en hielo durante 10 horas, con resuspensión final a 68°C.

III.2.-Extracción de ADN para Controles

Para los controles positivos se consiguieron muestras de sangre de cabra (proporcionadas por el Dr. Claudio Borteiro, Fac. de Veterinaria, UdelaR) y carne de vaca (obtenida en comercios del ramo).

El ADN de cabra se extrajo de glóbulos blancos presentes en una muestra de sangre (extraída en tubo tipo *Vacutainer* con anticoagulante EDTA (0.5% conc. final), mediante el método denominado por nosotros “micrométodo Proteinasa K” (Lic. Fabiana Ruibal comunicación personal), para extracción de ADN de sangre entera.

Para la obtención del precipitado de glóbulos blancos, se colocaron 0.5ml de sangre entera en un tubo de 1.5ml y se le agregó el Buffer de lisis de glóbulos rojos compuesto de Tris-HCl 10mM, pH 8, MgCl₂ 5mM, NaCl 10mM, hasta completar un volumen de 1,4 ml. Se centrifugó 2 minutos a 12 krpm, luego se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el precipitado nuevamente en buffer de lisis de glóbulos rojos hasta completar un volumen de 1,4 ml se invirtió y se centrifugó nuevamente hasta obtener el precipitado. Luego de obtenido el *precipitado* de glóbulos blancos se procedió a extraer el ADN, mediante el “micrométodo Proteinasa K”. Se disgregó por agitación leve el *precipitado* de glóbulos blancos con 0,270 ml de Buffer de lisis de glóbulos blancos (Tris HCL 10mM pH 8, EDTA 10mM pH8, NaCl 50mM, SDS 0.2%), a los que posteriormente se agregaron 30 µl de Proteinasa K (1 mg/ml), se homogenizó suavemente, y se incubó en un baño de agua a 56°C toda la noche. Pasada esta incubación, se agregaron 380 µl de una solución de NaCl 5M, se agitó en vortex durante 30 segundos y se centrifugó por 30 minutos a 13 krpm. Se extrajeron 500 µl de sobrenadante a los que se

agregaron dos volúmenes de etanol 100% por las paredes del tubo y se invirtió 5 veces con una posterior centrifugación de 15 minutos a 12 krpm, y se descartó el etanol. Luego se le agregaron al *precipitado* 250 μ l de EtOH 70%, se centrifugó 5 minutos a 12 krpm, y se descartó el sobrenadante. Esto se realizó dos veces, en la última vez se trató de sacar hasta la última gota de etanol 70% mediante el uso de micropipetas. Después de realizado este paso, se pusieron los tubos a secar en el vacuo secador rotatorio (*Speed Vac SC100 Savant with a Refrigerated Condensation Trap RT100 Savant*) en frío durante 3 minutos. Finalizado este tiempo se agregaron 100 μ l de H₂O mQ y se dejó resuspendiendo con hielo en heladera durante 10 horas con una resuspensión final a 68°C por tres minutos.

El ADN control de Vaca fue proporcionado por el tutor de este trabajo.

III.3.-Medición de los ADN extraídos

Se realizó mediante el uso de *Nanodrop Thermo Scientific*, que mide concentraciones con 1 μ l de muestra, con gran exactitud y reproducibilidad. Utiliza una nueva tecnología que usa la tensión superficial para mantener la muestra en su sitio y se eliminan las cubetas de medida. El software calcula automáticamente la concentración de los ácidos nucleicos siguiendo la relación: $A_{260nm} = 1 \text{ OD DNA} = 50 \mu\text{g/ml}$ dicha relación nos da la concentración de ADN presente en las muestras, y se estudió la relación entre absorbancias 260/280 para ver el grado de pureza de los mismos, considerándose puro en una relación mayor a 1,8.

III.4.-Estudio de detección de ADN de Vaca en mezcla de ADNs utilizados para el método Bravi

1) PCR

Se utilizaron los cebadores universales

L14816 5´-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3´ y

H15173 5´-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3´,

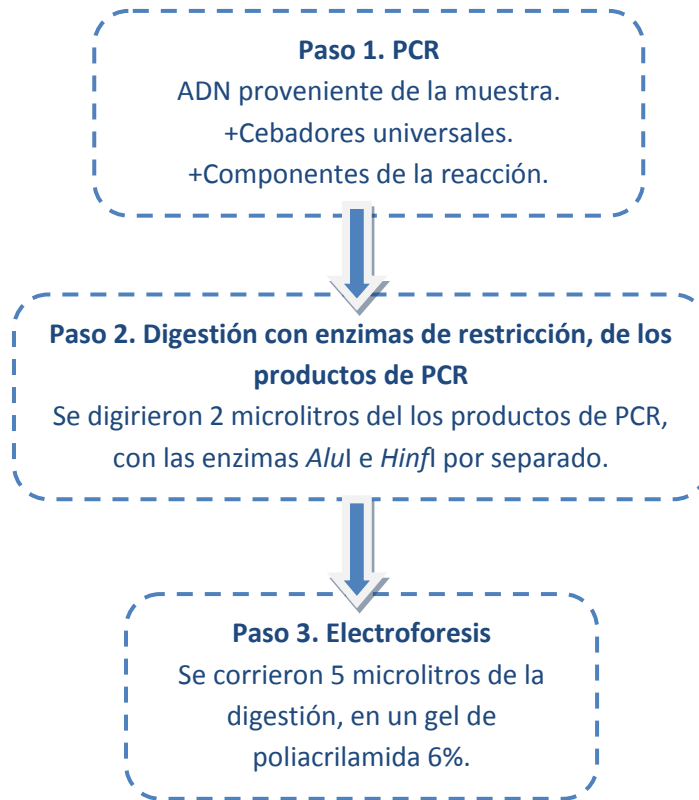
(Parson et al., 2000) para amplificar un fragmento de 358 pb del gen de CYTB. Para reacciones de PCR se realizaron diluciones de ADNs en concentraciones de 40, 20, 10, 5 y 1 ng de ADN de vaca sobre un fondo constante de 90 ng de ADN de cabra en un volumen final de 25 µl. Se utilizó el kit de PCR de *Bioline* (www.bioline.com , número de catálogo BIO-21080) conteniendo 2,5 µl de buffer 10x, MgCl₂ 5 mM, 1 unidades de *HybridPol™* ADN polimerasa , 100 µM de dNTP, y 4 µM de cada primer, Luego de 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, se realizaron 30 ciclos de amplificación utilizando el equipo de PCR Perkin Elmer como sigue: desnaturalización a 94°C por 20 segundos, anillado a 64°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos, con una extensión final a 72°C por 7 minutos.

2) Digestión con enzimas de restricción

Se digirieron 2 µl de producto de PCR con 10 unidades de las enzimas *AluI* y *HinfI* (Fermentas) por separado, en un volumen final de 25 µl por al menos 4 horas a 37°C, con posteriores pasos de desproteinización con cloroformo alcohol isoamilico 24:1.

3) Electroforesis

Los fragmentos de restricción se resolvieron gel al en 6% acrilamida bis acrilamida (30:08), la electroforesis se corrió por aproximadamente 60 minutos a 100V en Buffer TBE (40mM Tris-borato 1mM EDTA pH 8.0). El gel posteriormente fue teñido con plata y revelado según Sanguinetti (Sanguinetti et al., 1994).



Esquema.2. Pasos requeridos para llevar a cabo el método Bravi.

III.5.-Estudio de detección de ADN de vaca en mezcla de ADNs y muestras de Quesos por el método Matsunaga

1) PCR

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ l conteniendo 2,5 μ l de buffer 10x, $MgCl_2$ 5 mM, 1 unidades de *HybridPolTM* ADN polimerasa (provistos en el *Kit* de PCR de *Bioline* numero de catálogo BIO-21080), 100 μ M de dNTPs, y la mezcla de cebadores en la relación 1:1:0.4 cebador directo

F-SIM: (5´-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3´)

,reverso de vaca k: (5´-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3´),

reverso de cabra G (5´-CTCGACAAATGTGAGTTACAGAGGGA-3´)

respectivamente, (1 significa 4 μ M de primer en 25 μ l de solución de PCR).

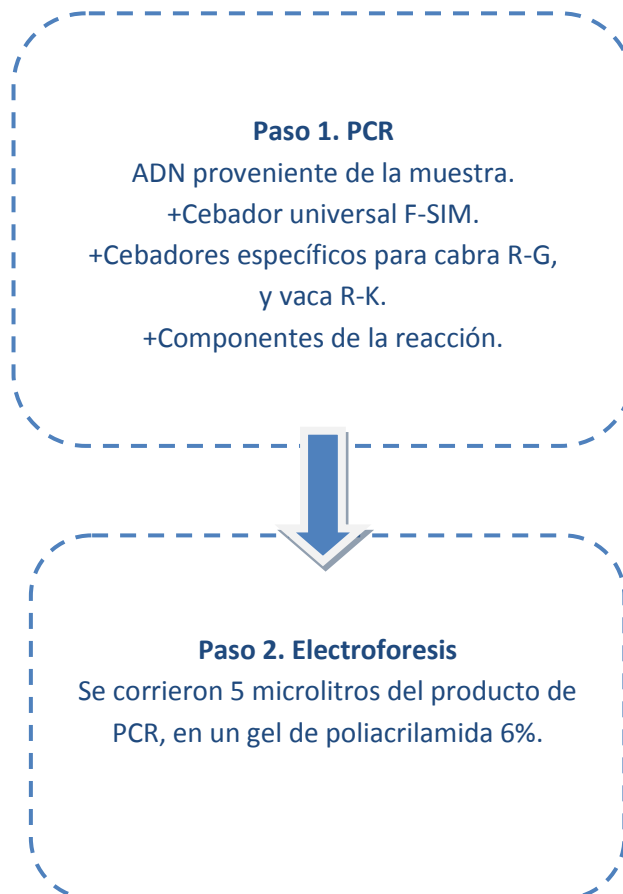
A esta mezcla se le agregaron los ADNs de la siguiente manera:

- a) Para el estudio del límite de detección del método se utilizaron diluciones de ADNs de Vaca con las siguientes concentraciones: 40 ,20 ,10 ,5 y 1 ng, sobre un fondo constante de 90 ng de ADN de cabra, y para el blanco de PCR se utilizó agua mili Q en vez de ADN.
- b) Para el estudio de las muestras problema en vez de utilizarse diluciones de ADN, se utilizaron los ADNs extraídos previamente a cada queso, de manera que hubiera aproximadamente 100 ng de ADN problema en cada tubo de PCR. Para el control positivo se mezclaron 100 ng de ADN de Cabra y 100 ng de ADN de Vaca, para el blanco de PCR se utilizó agua mili Q en vez de ADN.

Se realizaron 33 ciclos de amplificación utilizando el equipo de PCR Perkin Elmer de la siguiente manera: desnaturalización a 94°C por 20 segundos, anillado a 64°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos, con extensión final a 72°C por 7 minutos.

2) Electroforesis

Luego de la amplificación, se analizaron 5 µl de la solución de PCR mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6%. La corrida se extendió por 60 minutos a 100V en una dilución 1x del buffer TBE 5x (54 g de Tris base. 27,5 g de ácido bórico. 20 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0), el gel posteriormente se tiñó con plata y se reveló según (Sanguinetti et al., 1994).



Esquema.3. Pasos requeridos para realizar el método Matsunaga

IV-RESULTADOS

IV.1.- Medida de concentración de ADNs extraídos de las muestras de quesos

La extracción de ADN para las muestras de queso, se realizó mediante un nuevo método de extracción, basado a su vez en un método para extracción de ADN de una matriz vegetal (Dellaporta et al., 1983). Este método produjo buenos rendimientos en cantidad y pureza según se muestra en la tabla 1, comparado con la extracción de ADNs mediante un kit comercial (datos no mostrados).

Muestras de quesos	Concentración ng/ μ l	Pureza (abs 260/280)
29	260	1,62
30	33	1,68
31	42	1,65
36	37	1,12
32*	190	N.D
33*	1270	N.D
34*	1850	N.D
35*	280	N.D

Tabla.1. Medida de las concentraciones y pureza (calculado como la relación de absorbancias 260/280) de los ADNs extraídos a partir de 250 mg de muestra. *estas muestras fueron analizadas por Marianella Amilibia. N.D=no determinado.

IV.2.-Estudio del desempeño del método RFLP para detección de especies (Mét. Bravi)

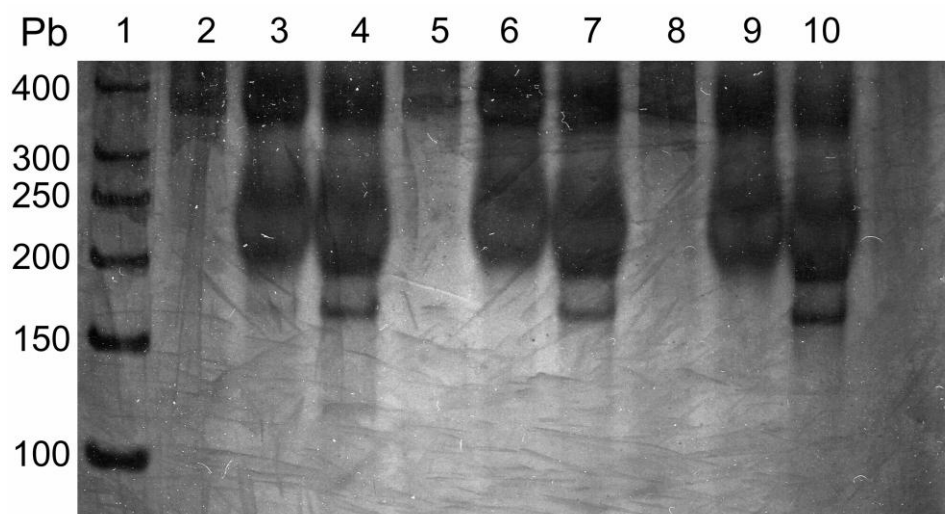


Figura.3. Gel de poliacrilamida 6% de fragmentos de restricción realizados con las enzimas *HinfI* y *AluI* sobre mezcla de ADNs de Cabra y Vaca amplificados con cebadores universales. **Carril 1.** M.P.M. 50 Pb (Fermentas); **Carril 2.** cabra 90 ng/μl + vaca 40 ng/μl s/cortar; **Carril 3.** cabra 90 ng/μl c/*AluI* + vaca 40 ng/μl; **Carril 4.** cabra 90 ng/μl + vaca 40 ng/μl C/*HinfI*; **Carril 5.** cabra 90 ng/μl + vaca 20 ng/μl s/Cortar; **Carril 6.** cabra 90 ng/μl + vaca 20 ng/μl c/*AluI*; **Carril 7.** cabra 90 ng/μl + vaca 20 ng/μl c/*HinfI*; **Carril 8.** cabra 90 ng/μl + vaca 10 ng/μl s/Cortar; **Carril 9.** cabra 90 ng/μl + vaca 10 ng/μl c/*AluI*; **Carril 10.** cabra 90 ng/μl + vaca 10 ng/μl C/*HinfI*.

Se realizó una mezcla de ADN de Cabra y Vaca obtenidos de sangre y carne respectivamente en proporciones de 90:40, 90:20, 90:10 (ng de ADN de cabra: ng de ADN de vaca), que fueron amplificados mediante cebadores universales y luego se digirieron con las enzimas *AluI* e *HinfI*. Posteriormente se sembraron y corrieron en un gel: el producto de PCR sin digerir, digerido con *AluI* y digerido con *HinfI*, para cada mezcla. Como se observa en la figura 1, en el carril 3 (que corresponde al producto de PCR digerido con la enzima *AluI*), aparecen dos bandas: una a aproximadamente 200 pb y la segunda más tenue, a aproximadamente 160 pb que corresponderían a la digestión del fragmento amplificado de ADN de Vaca, ya que no existen sitios de corte con esta enzima para el fragmento de Cabra. En el siguiente carril (4) podemos observar la digestión con *HinfI*. Se constata la presencia de tres bandas dos más

nítidas a aproximadamente 190 y 160 pb que podrían corresponder tanto a la presencia de Vaca o Cabra ya que el patrón de corte para *Hinf*I de estas especies a esta altura es similar, y una banda más tenue a aproximadamente 120 pb que correspondería a la presencia de Vaca. En las mezclas siguientes las bandas más tenues no pueden llegar a distinguirse.

IV.3.-Estudio de detección de especies mediante cebadores reversos específicos. (Mét. Matsunaga)

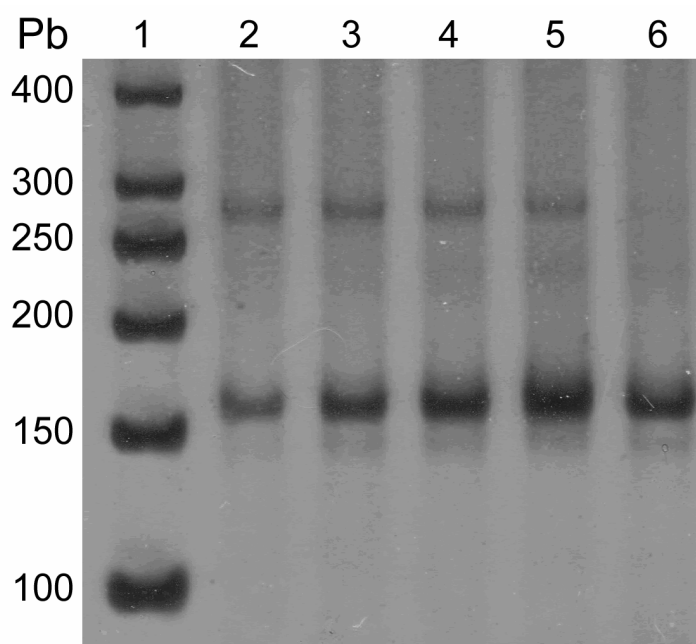


Figura. 4. Gel de poliacrilamida 6% teñido con AgNO_3 , de productos de PCRs utilizando como molde diluciones decrecientes (de izquierda a derecha) de ADN de Vaca en un fondo de 90 ng de ADN de Cabra, **Carril 1.** M.P.M. 50 Pb (Fermentas), **Carril 2.** 36 ng de ADN de Vaca (30%), **Carril 3.** 18 ng (20%), **Carril 4.** 9 ng (10%), **Carril 5.** 4.5 ng (5%), **Carril 6.** 0.9 ng (1%). En esta imagen se observan dos bandas, la de mayor peso molecular (289 pb) perteneciente amplicón de Vaca y una de menor peso molecular (157 pb) que corresponde al amplicón de Cabra. Se aprecia la presencia del amplicón de Vaca en todas las reacciones, hasta el Carril 5 inclusive, correspondiente a un 5% de presencia de ADN de Vaca en la mezcla.

Se mezclaron ADNs obtenidos a partir de sangre de Cabra y carne de Vaca en orden decreciente de ADN de Vaca (36 ng, 18 ng, 9 ng, 4.5 ng y 0.9 ng) en un fondo de 90 ng de ADN de Cabra. En la figura 2 se muestra la presencia de dos bandas: una más intensa de 157 pb que corresponde a la amplificación de ADN de Cabra y una banda menos intensa de 274 pb

pertenecientes al producto de PCR de ADN de Vaca, la presencia de la banda correspondiente al amplicón de Vaca se observa hasta una concentración de un 5%, y luego a una concentración de 1% de ADN de vaca (con respecto al ADN de cabra) la señal correspondiente a la presencia de vaca deja de ser visible en las condiciones empleadas.

IV.4.-Detección de la presencia de especies no declaradas en quesos de cabra mediante el uso de cebadores reversos específicos

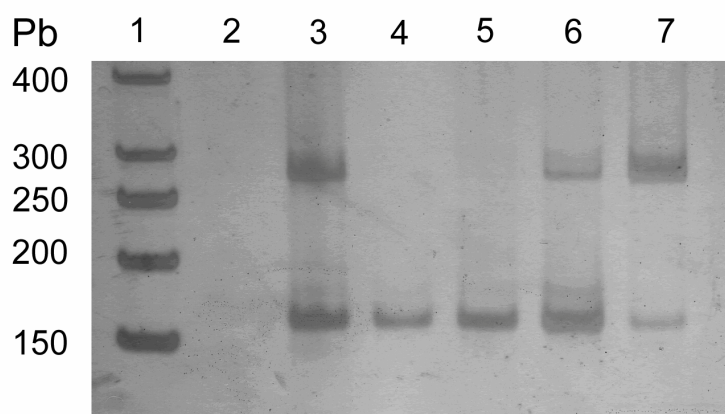


Figura. 5. Gel de poliacrilamida 6% teñido con AgNO_3 , donde se muestran los productos de PCR usando el método modificado de Matsunaga para muestras de quesos y. **pb** (pares de bases). **Carril 1.**M.P.M. 50 pb (Fermentas), **Carril 2** Blanco de PCR, **Carril 3.**Control positivo Mezcla de 1 μl de ADN de Cabra (100 ng/ μl) y 1 μl de ADN de Vaca (100 ng/ μl), **Carril 4.**Muestra de Queso n°29, **Carril 5.**Muestra de queso n°30, **Carril 6.**Muestra de Queso n° 31, **Carril 7.** Muestra de Queso n° 36.

En el control positivo se observan dos bandas, la de menor peso molecular (157 pb) corresponde a la presencia de ADN mitocondrial de cabra, y la segunda de mayor peso molecular (274 pb) que corresponde a la presencia de ADN mitocondrial de vaca. Como se puede apreciar en los carriles 6 y 7, donde se corrieron los productos de PCR de las muestras n°31 y n°36 respectivamente, vemos la presencia de dos bandas que evidencia la presencia no sólo de ADN de cabra sino también de vaca.

En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos del estudio de los quesos analizados en esta tesis, y datos previamente analizados de otros quesos por el Lic. Martín Fernández, marcando las discrepancias o no entre las especies declaradas y las detectadas.

Muestras de quesos	Especie(s) declarada(s)	Especie(s) detectada(s)	Discrepancias entre lo declarado y detectado
29	Cabra	Cabra	No
30	Cabra	Cabra	No
31	Cabra y Vaca	Cabra y Vaca	No
36	Cabra	Cabra y Vaca	Si
32*	Cabra	Cabra y Vaca	Si
33*	Cabra	Cabra	No
34*	Cabra	Cabra y Vaca	Si
35*	Cabra	Cabra	No

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos mediante el método Matsunaga con cebadores específicos y su comparación con lo declarado en el rótulo de cada producto.

*Muestras Analizadas por el Lic. Martín Fernández.

Método de extracción de ADN

La implementación del método Dellaporta para la extracción de ADN a partir de la matriz Quesos dio buenos resultados en base a rendimientos y pureza de los ADNs, esto se vió reflejado en que todos los ADNs extraídos de quesos amplificaron bien a la hora de someterlos a la PCR. En la tabla 1 se observó una diferencia importante entre la concentración de ADN del queso N°29 con los demás ADNs de los quesos analizados, y pensamos que se debe a variaciones en el número de células somáticas presentes en la leche que fué utilizada para la manufactura de dichos productos, y que varía dependiendo de varios factores como por ejemplo la edad de los animales, las estaciones, enfermedades, etc.

Métodos moleculares como herramientas para detectar la presencia de ADN de vaca, en productos lácteos derivados de la leche de cabra más específicamente Quesos.

En estos estudios se vio que el método Matsunaga (Matsunaga et al., 1999) es el que posee mayor nivel de detección bajo las condiciones de estudios antes descritas. El método es capaz de detectar hasta un mínimo de 4,5 ng de ADN de Vaca en un fondo de 90 ng de ADN de Cabra, simulando el caso de una adulteración. La puesta a punto de este método dúplex, nos aporta una herramienta capaz de detectar sin ambigüedades la presencia de ADN de Vaca. Igualmente sería recomendable hacer a cada muestra sometida a análisis este estudio por duplicado o triplicado, para descartar posibles resultados erróneos, que pueden darse debido a variaciones en la reacción. Asimismo habría que hacer un control con ADN y cebadores foráneos que sepamos que amplifican bajo las condiciones del ensayo, para descartar cualquier inhibición de la reacción.

El método descrito por Bravi (Bravi et al., 2004) en las condiciones señaladas anteriormente, nos demostraron que se puede distinguir la presencia hasta de 40 ng de ADN de vaca en un fondo de aproximadamente 90 ng de ADN de cabra (30% V/C), por lo que el nivel de detección sería menor. Para descartar la responsabilidad del tiempo de digestión en el resultado, se podría aumentar el mismo.

Este método a la hora de estudiar mezclas lo encontramos más engorroso, debido a que se comparten algunas bandas por parte de ambas especies que dificultan el análisis. Además los tiempos de análisis son mayores, debido a que se necesitan más pasos que el método Matsunaga (la digestión, y una posterior desproteínización para que la proteína no enmascare las bandas en el gel). También este método es más costoso ya que requiere contar con los cebadores y ambas enzimas de restricción, aunque cabe destacar que los cebadores que utilizan son bastante robustos y producen gran cantidad de producto amplificado, lo que es útil a la hora de estudiar muestras muy degradadas como alimentos que han sufrido cocción o muestras forenses que es para lo que originalmente este método se creó.

Tomando en cuenta estos resultados fue que decidimos estudiar las muestras de quesos de cabra mediante el método Matsunaga. En la Fig. 5 se muestra el gel en el cual se corrió el producto de PCR de cuatro quesos, de los cuales tres estaban declarados como puros de cabra (muestras #29,30,36) y uno declarado como mezcla de cabra y vaca (muestra #31). En dicho ensayo se vio, que efectivamente los quesos #29 y #30 eran puros de cabra y que el queso #31 presentaba ADN de vaca lo cual se correspondía con lo declarado por la empresa. Sin embargo, el queso #36 también presentó la banda de aproximadamente 274 pb, perteneciente a la presencia de ADN vaca, lo cual sería evidencia de una adulteración no declarada de dicho queso.

A partir de los resultados presentados en esta tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

El método de extracción de ADN para las muestras de quesos (Dellaporta modificado) arrojó buenos resultados en cuanto a cantidad y calidad de ADN (ya que en todos los casos se obtuvo ADN amplificable) aunque los valores de pureza, calculado como la relación entre absorbancias 260/280 fueron inferiores al valor óptimo de 1,8. A su vez este método posee otras virtudes: no es un método comercial, es accesible desde el punto de vista de costos y de los materiales, y es rápido. Este método busca en una de las modificaciones realizadas al método original reducir los tiempos de tratamiento. Asimismo se buscó mejorar la pureza de extracción del ADN con el agregado de la enzima Proteinasa K como otra modificación al protocolo original, debido a la cantidad de proteínas presentes en la matriz queso. Posiblemente se puedan seguir realizando perfeccionamientos y puestas a punto a este método, para lograr mayores y mejores rendimientos en esta matriz o en otras.

En cuanto al desempeño de los métodos para la detección de contaminación y/o adulteraciones de quesos de Cabra con Leche de Vaca, según los datos analizados y los resultados obtenidos, bajo las condiciones de estudio antes mencionadas, podemos decir que el método de amplificación con cebadores específicos, es el que arrojó los resultados más satisfactorios, ya que fue posible detectar un mínimo de 5% de ADN Bovino en mezcla con ADN Caprino, en contraste con el método de identificación mediante PCR-RLFP cuyo límite inferior fue de 30%. El hecho de que en las muestras analizadas se comportaran de acuerdo a lo ensayado con los controles, nos permite concluir que es un método a tener en cuenta a la hora de estudiar la problemática de la adulteración, para combatir la competencia desleal, proteger e informar a los consumidores de los componentes de los productos ya que algunos, prefieren ciertos productos no solo por su sabor, sino que también por ciertas propiedades que le facilitan o permiten, el consumo de los mismos,

como las personas que son intolerantes a la lactosa o las personas que no pueden consumir productos derivados de animales Bovinos.

VII-PERSPECTIVAS

Este estudio deja abierta la puerta a futuros estudios para profundizar y perfeccionar el análisis y la implementación de métodos de detección moleculares para la certificación de productos manufacturados. Como perspectivas para los métodos empleados podríamos decir que el método Bravi en la etapa de PCR podría llegar a utilizarse, en una PCR-TR como un control de cantidad y calidad de ADN total en una mezcla, ya que amplifica ambas especies.

En este sentido se estudió teóricamente la modificación de los cebadores reversos específicos (el cebador directo, F-SIM, propuesto por Matsunaga et, al., 1999. no parece adecuado para este tipo de estudio), con el fin de crear cebadores directos y reversos específicos para reconocer y cuantificar cada especie mediante la técnica de Syber Green. Se estudiaron las secuencias de los cebadores de manera de encontrar zonas de no homología (*mismatches*) entre los cebadores de una especie con la secuencia de la otra, para lograr la diferenciación entre ambas especies, y teniendo en cuenta especialmente los *mismatches* en los extremos 3' de los mismos, ya que es sabido son esenciales a la hora de dar especificidad a la reacción.

También se tuvieron en cuenta factores como evitar la formación de estructuras secundarias de bucles (*hairpins*) debido a la auto complementariedad de bases dentro de la propia secuencia de los cebadores. A su vez se trató de evitar la complementariedad entre los cebadores para que no se formen dímeros. Otra característica que se tuvo en cuenta es que los cebadores no difieran mucho en sus Tms (temperaturas de fusión) con el fin de que no haya diferencias de rendimientos en la PCR debido a la temperatura. Por último y no menos importante se trató de que los amplicones tengan un tamaño de

aproximadamente 100 pb ya que se obtienen mejores resultados en la PCR-TR con productos de ese tamaño.

Este estudio teórico se realizó con el programa *OligoAnalyzer* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), y se llegó a crear las siguientes secuencias de cebadores que pensamos podrían ser utilizadas para este fin:

Cebadores para Vaca

Oligo	Secuencia 5'a 3'	longitud (nt)	Tm 1	Tm 2	Tamaño del amplicón
F K	CCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGAC	26	76°C	69,3°C	
R K	CATATATAAGCAGATAAAAAACATTGAAG	29	72°C	61,3°C	97 pb *

Tm 1 fue calculado mediante la ecuación $Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$

Tm 2 fue calculado con el programa *OligoAnalyzer*

* utilizando los cebadores F k (cebador directo de Vaca) y R k (cebador reverso de vaca)

Cebadores para Cabra

Oligo	Secuencia 5'a 3'	longitud (nt)	Tm 1	Tm 2	Tamaño del amplicón
F G	TTTCCTCTGTAACCTCACATTTGTCGAG	27	76°C	66,9°C	
R G1	GAATAGGCAGATAAAGAATATTGATG	26	68°C	60°C	97 pb *
R G2	CTAGAAAGGTATATGATCCATAATATAGAC	30	78°C	61,6°C	143 pb **

Tm 1 fue calculado mediante la ecuación $Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$

Tm 2 fue calculado con el programa *OligoAnalyzer*

* Utilizando los cebadores FG (cebador directo de Cabra) y R G1 (cebador reverso de Cabra 1)

** Utilizando los cebadores FG (cebador directo de Cabra) y R G2 (cebador reverso de Cabra 2)

Pensamos que mediante el uso de la técnica de PCR-TR podremos lograr , un mayor nivel de detección y tener datos cuantitativos de las adulteraciones, ya que nos apoyamos en experiencias que demuestran que se podría diferenciar estas especies (y otras), arrojando un nivel de detección del 0.5% (López-Andreo, 2005), (López-Calleja, 2007a), (López-Calleja, 2007b).

También se podrían probar la utilización de métodos de RFLP, haciendo uso de la secuencia de la β -Caseína para diferenciar las especies, siguiendo las experiencias de Plath (Plath *et al.*, 1997).

Siguiendo en esta misma línea, para un estudio más preciso del nivel de detección, podrían fabricarse, quesos de cabra mezcla, con distintas cantidades conocidas de leche de vaca agregada. Se compararía de esta

forma el grado de detección y la cantidad de ADN disponible para ser amplificado, debido a que en la leche, la cantidad de células somáticas (leucocitos y células epiteliales mamarias, de donde se extrae el ADN mitocondrial) (Lipkin *et al.*, 1993), y (Amills *et al.*, 1997), es menor que la disponible en los controles, y a su vez varía dependiendo de la edad del animal, el estado de salud del mismo y también de variaciones en las estaciones.

En suma, creemos que estos resultados demuestran la capacidad de los métodos moleculares para detectar cualitativamente la presencia o ausencia de ADN de Vaca en quesos de Cabra en productos nacionales. Esto se suma a otras experiencias realizadas por otros investigadores (Santos *et al.*, 2003), (Maudet, and Taberlet, 2001) por lo que podemos esperar que dichas herramientas puedan llegar a ser elementos útiles en un futuro, a la hora desarrollar protocolos para autenticar la calidad de dichos productos.

VIII-Bibliografía

Alferez, M.J.M., Barrionuevo, M., Lopez Aliaga, I., Sanz Sampelayo, M.R., Lisbona, F., Robles, J.C., Campos, M.S. 2001. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *J. Dairy Res.* 68, 451–461.

Alvarez, M.J., Lombardero, M., 2002. IgE-mediated anaphylaxis to sheep's and goat's milk. *Allergy* 57 (11), 1091–1092.

Amills, M., Francino, O., Jansa, M., and Sanchez, A. 1997. Isolation of genomic DNA from milk samples by using Chelex resin, *J. Dairy Res.*, 64, 231.

Asti, H., 2011, comunicación personal.

Bravi C, Lirón J, Mirol P, Ripoli M, Peral-García P, Giovambattista G. 2004. A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene, *Legal Medicine* 6, 246–51.

Cartoni, G.P., Coccioli, E., Jasionowska, R., and Masci, M. 1999. Determination of cows' milk in goats' milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions, *J. Chromatogr. A*, 846, 135.

Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T., and Kato, S. 1990. Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay, *Meat Science* 27, 119–128.

Commission Regulation, Reference method for the detection of cows' milk and caseinate in cheeses from ewes', goats' and buffaloes' milk, EC regulation No 213/2001 of 9 January 2001, *Off. J. Eur. Commun.*, L37, 51–60.

Dellaporta, S.L., Wood, J., James B. Hicks, J.B. 1983. A Plant DNA Miniprep: Version II PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER Volume 1, Number 4:19-21.

Ebbehoj, K. F. and Thomsen, P. D. 1991. Differentiation of closely related species by DNA hybridisation, *Meat Science* 30, 359–366.

Haenlein, G.F.W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin. Res.* 51, 155–163.

Herman, L. 2001. Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *Journal of Dairy Research*, 68, 429–436.

<http://www.bioline.com>

<http://www.capraispana.com/>

<http://caprinoalto.com.uy/>

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmanith, T., Michel, H. 2000. Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure*. 8:669-84.

Jenness, R. 1980. Composition and characteristics of goat milk:review 1968–1979. *J. Dairy Sci.* 63, 1605–1630.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA* ;86, 196–200.

Lipkin, E., Shalom, A., Khatib, H., Soller, M., Friedmann, A. 1993. Milk as a source of Deoxyribonucleic Acid and as a substrate for the Polymerase Chain Reaction. *J Dairy Sci* 76,2025–2032.

López-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M.I., Puyet, A. 2005. Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain. *Analytical Biochemistry* 339, 73–82.

López-Calleja, I., González Alonso, I., Fajardo, V., Rodríguez, M. A., Hernández, P. E., García, T. 2005.. PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *International Dairy Journal* 15, 1122–1129.

López-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Martin, I., Hernandez, P.E., Garcia, T., and Martin, R. 2007. Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control*. 18, 1466.

López-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., Martin, I., Hernandez, P.E., Garcia, T., and Martin, R. 2007. Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. *Int. Dairy J.* 17, 729.

Marmioli N., Peano C. and Maestri E. 2003. Advanced PCR techniques in identifying food components. En: Food authenticity and traceability. Lees, M. (Ed) pp 3-33. CRC Press. FL. USA.

Matsunaga, T. Chikuni, K. Tanabe, R. Muroya, S. Shibata, K. Yamada, J. Shimura, Y. 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay, *Meat Sci.* 51 143–148.

Maudet, C. ,Taberlet, P. 2001. Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism *Journal of Dairy Research* 68, 229-235.

Meyer, R., Hofelein, C., Luthy, J., & Candrian, U. 1995. Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis: a simple

method for species identification in food. *Journal of AOAC International* 78, 1542–1551.

Muraro, M.A., Giampietro, P.G., Galli, E. 2002. Soy formulas and Non bovine milk. *Ann. Allergy Asthma Immunol* 89 ,97–101,

Orlando, J.P., Breton-Bouveyron, A. 2000. Anaphylactoid reaction to goat's milk. *Allergy Immunol.* 32, 231–232,

Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M, Steinlechner M. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int J Legal Med.*114, 23–8.

Pellegrino, L., Tirelli, A., and Masotti, F. 1992. Detection of cow milk in non-bovine cheese by HPLC of whey proteins. Note 2: Application to ewe's milk cheeses, *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 43,297.

Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol.* 48, 427–34.

Pessler, F., Nejeat, M. 2004. Anaphylactic reaction to goat's milk in a cow's milk-allergic infant. *Pediatr. Allergy Immunol.* 15, 183–185.

Plath, A., Krause, I., Einspanier, R. 1997. Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Z Lebensm Unters Forsch A* 205:437–441.

Ram, J. L., Ram, M. L., and Baidoun, F. F. 1996. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 44, 2460–2467.

Rea, S., Chikuni, K., Branciarri, R., Sukasi Sangamayya, R., Ranucci, D., & Avellini, P. 2001. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *Journal of Dairy Research.* 68, 689–698.

Restani, P., Beretta, B., Fiocchi, A., Ballabio, C., Galli, C.L. 2002. Cross-reactivity between mammalian proteins. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 89 , 11–15.

Richter, W., Krause, I., Graf, C., Sperrer, I., Schwarzer, C., and Klostermeyer, H. 1997. An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine γ -caseins. *Zeitschrift Lebensmittel Unters. Forsch.*, 204, 21.

Robin ED, Wong R. 1988. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol* ;36:507–13.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.

Sanguinetti, C. J., Días Neto, E., & Simpson, A. J. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 17, 914-921.

Santos, J., Fernandez, P., Bardsley, R. 2003. PORTUGUESE “PDO” CHEESE AND SPECIES ORIGIN OF MILK *EJEAFChe*, 2, 476-479.

Schultz, B.E., Chan, S.I. 2001. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*; 30:23-65.

Agradecimientos

A Dios por darme a mis padres Ricardo y Margarita.

Al Dr. Claudio Martinez Debat por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. A las Dras. Sabina Vidal y Cora Chalar por sus consejos, y evaluaciones de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio las Lic. Mailén Arleo y Fabiana Ruibal, el Lic. José Pereyra, y a todos los integrantes de la sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias UdelaR, que hicieron más fácil y disfrutable esta tarea.

Al Dr. Hugo Asti.

Al Dr. Claudio Borteiro.

A todos mis amigos y compañeros de camino.

Muchas Gracias.