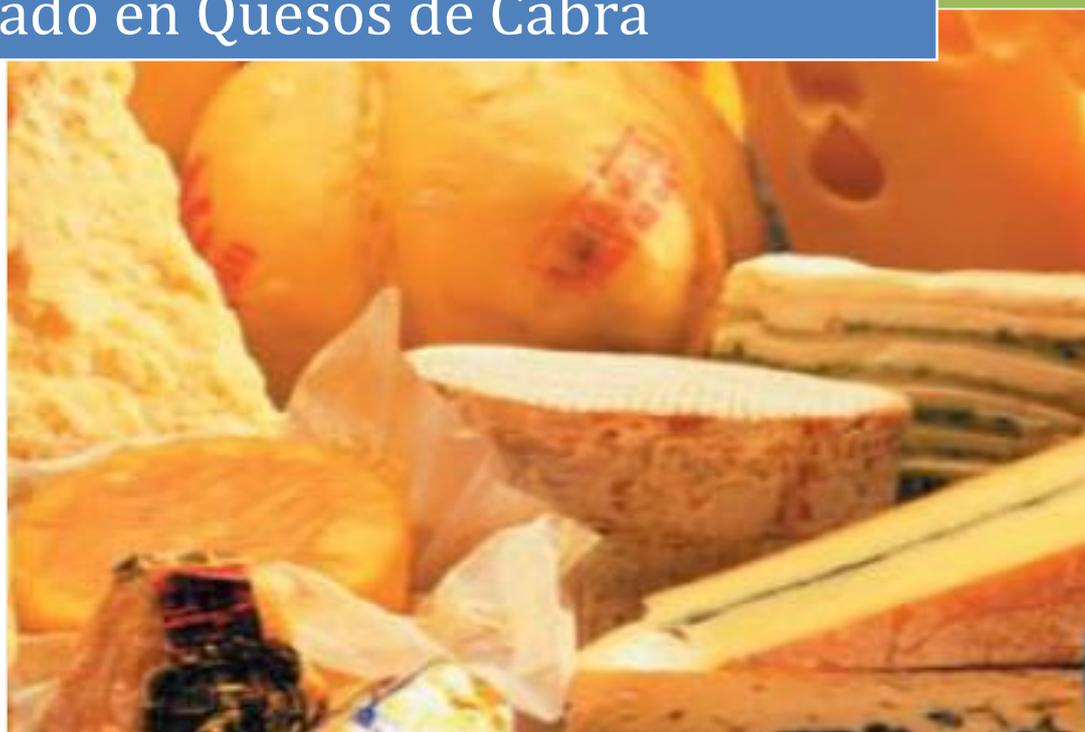


Detección de leche bovina y maíz genéticamente modificado en Quesos de Cabra



Josefina Correa

TUTOR: Dr. QF. Claudio Martínez Debat

LaTraMa– Sección Bioquímica

Fac. Ciencias, UdelaR

[Noviembre de 2013]

“La seguridad de los alimentos ha de ser uno de los principales intereses del conjunto de la sociedad, especialmente de los poderes públicos y de los productores de alimentos”

Citado por el Libro Blanco de la Comunidad Europea, Bruselas 2000.

Contenido

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
1.1 Derechos del consumidor	7
1.2 Trazabilidad alimentaria	7
1.3 La matriz: Queso de cabra	8
1.3.1 Manufactura del queso de cabra	10
1.4 Adulteración de lácteos	12
1.4.1 Evaluación de los componentes de una matriz alimentaria	13
1.5 Organismos genéticamente modificados	14
1.5.1 ¿Qué son?	14
1.5.2 Situación mundial	14
1.5.3 Uruguay	16
1.6 Detección de especies y transgénicos a partir de ADN	19
1.7 Antecedentes	21
2 OBJETIVOS GENERALES	22
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4 MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 Estrategia general utilizada	23
4.2 Obtención de ADN control	23
4.2.1 Descripción del método de extracción de ADN para quesos:	26
4.3 Cuantificación del ADN obtenido	26
4.4 Estimación de la integridad del ADN extraído	26
4.5 Amplificación por PCR	27
4.5.1 Detalle de la metodología utilizada:	28
A. Detección de especies animales	28
ESTRATEGIA 1	29

ESTRATEGIA 2.....	30
B. Detección de maíz genéticamente modificado	32
4.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	33
5 RESULTADOS y DISCUSIÓN	34
5.1 Extracción de ADN y cuantificación	34
5.2 Amplificación por PCR	39
5.2.1 Puesta a punto de la técnica.....	39
5.2.2 Detección de ADN de cabra y de vaca.	39
ESTRATEGIA 1.....	39
ESTRATEGIA 2.....	41
¿Reacción cruzada?	45
Detección de maíz genéticamente modificado	46
6 CONCLUSIONES	50
6.1 Extracción de ADN	50
6.2 Amplificación por PCR	51
BIBLIOGRAFÍA.....	53
ANEXO – Abreviaturas.....	59

RESUMEN

El queso de cabra es sin dudas un producto exótico para los paladares uruguayos. Pero poco a poco se va introduciendo en comercios del ramo debido a la demanda de algunos que gustan de su sabor y otros que por motivos religiosos o de salud no pueden consumir el común queso de vaca.

La problemática de la adulteración de alimentos es un punto que afecta tanto a la economía como a la salud e incluso la libertad de elección del consumidor. Para éste, la calidad de los productos y su procedencia es de vital importancia hoy en día. Esto supone una gran presión para los organismos gubernamentales de contralor que deben llevar un estricto control de los diferentes niveles de la cadena de producción de alimentos (Herman, 2001). Es por esto, que como científicos buscamos proveer de herramientas adecuadas para un control eficiente. En este marco, la utilización de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) da la posibilidad de detectar la presencia tanto de especies animales como vegetales contenidas en las diferentes matrices alimentarias.

En nuestro laboratorio existe una vasta experiencia que ha permitido desarrollar técnicas específicas como MeDeA y DeVa, que permiten la detección de especies animales y vegetales, respectivamente, en alimentos procesados. Se ha trabajado en diferentes matrices alimentarias, como panchos, hamburguesas, dulces de membrillo y polenta, lo que implica un conocimiento previo interesante a la hora de plantearnos nuevos desafíos.

El objetivo general de este trabajo es contribuir con herramientas moleculares al desarrollo de prácticas de trazabilidad de alimentos en nuestro país. Es así que utilizamos el caso de los quesos de cabra para detectar la presencia de leche bovina y de maíz genéticamente modificado en diferentes muestras obtenidas en el mercado uruguayo y mexicano. Los abordajes planteados en el párrafo anterior fueron utilizados para cumplir con los objetivos planteados. Dichas metodologías tienen como paso principal el uso de la PCR, que fue llevada a cabo con variadas estrategias de cebadores. En el caso de la detección de especies animales el gen blanco fue el de *citocromo b* mitocondrial, y se utilizaron 2 metodologías: la primera propuesta por Matsunaga *et al.* (1999) y la segunda resultó del diseño en nuestro laboratorio de cebadores a partir de los cebadores reversos específicos de la estrategia de Matsunaga *et al.* (1999).

Como ejemplo de análisis de especies vegetales se analizó la presencia de maíz y se utilizó el gen *hmgA*, de ese cereal. Además, se realizó el análisis de transgenicidad en las muestras donde se encontró maíz, utilizando como blanco las secuencias 35S y t-Nos correspondientes al promotor del virus del mosaico del coliflor y el terminador de la nopalina sintasa, respectivamente. En este caso, los cebadores utilizados fueron tomados del Compendium of Reference Methods for GMO analysis (J.R.C.).

Los resultados arrojados en el presente trabajo indican que los métodos de extracción de ADN utilizados para cada muestra fueron adecuados y permitieron el uso posterior del ADN extraído al ser de buena calidad y cantidad suficiente. El análisis especie-específico de las muestras de queso indicó que utilizando la estrategia de Matsunaga *et al.* (1999) el 85% de las mismas presenta ADN de vaca, mientras que solo el 28% lo indica en su etiqueta. Los resultados no fueron consistentes en su totalidad cuando se utilizaron los cebadores diseñados en nuestro laboratorio, por lo que a lo que estos refiere, se debe seguir trabajando ya sea para encontrar parámetros de amplificación más adecuados o en la modificación de su secuencia generando cebadores nuevos que sean más específicos y por tanto adecuados para cumplir con los objetivos planteados.

Por otro lado, se encontró que cinco de siete muestras contienen ADN de maíz. Estas resultaron todas transgénicas al amplificar el marcador de transgenicidad 35S, y sólo en tres se encontró otro marcador de transgenicidad, el terminador t-Nos, indicando la presencia de los eventos Bt11, NK603 o GA21. Para avanzar en la identificación del material transgénico presente en las muestras debería procederse a la amplificación con cebadores específicos de evento.

INTRODUCCIÓN

1.1 Derechos del consumidor

Los casos de fraudes alimentarios no son recientes, sino que existen desde tiempos tempranos en la industria mundial. Hay alimentos procesados que son blancos característicos de fraudulencia, como los basados en pescado procesado (Botti & Giuffra, 2010), productos cárnicos (Kocher *et al.*, 1989; Matsunaga *et al.*, 1999), jaleas y yogures (Ortola Vidal *et al.*, 2007), y derivados de maíz (Piñeyro-Nelson *et al.*, 2009), entre otros.

En Uruguay, la defensa del consumidor está regulada por la ley 17.250 (11 de agosto de 2000) que establece en su artículo 6° que el primer derecho básico de cualquier consumidor es “la protección de la vida, la salud y la seguridad contra los riesgos causados por las prácticas en el suministro de productos y servicios considerados peligrosos o nocivos.” En este mismo artículo se establece que la información brindada por los productores debe ser “suficiente”, “clara”, y “veraz”, lo que implica no ocultar ningún dato que pueda ser relevante.

El artículo 11° de la misma ley, indica que “los proveedores de productos y servicios que, posteriormente a la introducción de los mismos en el mercado, tomen conocimiento de su nocividad o peligrosidad, deberán comunicar inmediatamente tal circunstancia a las autoridades competentes y a los consumidores. En este último caso, la comunicación se cumplirá mediante anuncios publicitarios.” Es en este marco que nuestro laboratorio busca contribuir con herramientas para dar a los consumidores la certeza de qué es lo que verdaderamente están consumiendo, para que pueda existir una “protección de la vida, la salud y la seguridad contra los riesgos”, ya que el consumo de alimentos cuyos ingredientes no están debidamente identificados puede atentar contra estos principios.

1.2 Trazabilidad alimentaria

Cada vez se habla más de trazabilidad entre los gobiernos, las empresas y los consumidores frente a la creciente demanda de seguridad alimentaria y de productos con atributos específicos. En este sentido, las obligaciones sobre el etiquetado son cada vez más estrictas, para que llegue de manera correcta la información a los consumidores y puedan decidir de manera responsable sobre la ingesta o no del alimento en cuestión.

La trazabilidad es definida como la “habilidad utilizada para identificar el origen de un alimento o de sus productos, tan lejos en la secuencia de producción como sea necesario, y realizar un seguimiento del mismo a lo largo de toda o parte de su vida útil” (López *et al.*, 2003). Esta resulta, por tanto, una herramienta fundamental para garantizar la seguridad alimentaria. Desde el 1 de enero de 2005 la Unión Europea (UE) tiene como requisito legal la trazabilidad en todas las empresas alimentarias (Reglamento (CE) 178/2002), lo que marca una tendencia en este sentido.

La trazabilidad es una herramienta que puede contribuir con la protección del consumidor contra prácticas engañosas del comercio y facilitar la competencia leal mediante una descripción exacta de los productos (Codex Alimentarius, 2006). Para las empresas, constituye un útil sistema de gestión y una ventaja comercial frente a sus clientes, que buscan un producto diferenciable, seguro y saludable.

Para que los sistemas de trazabilidad sean aplicables, deben ser rápidos y económicos: cuanto mejor y más preciso sea el sistema, más eficaz será el sistema de seguridad alimentaria y los problemas de calidad serán identificados y resueltos de manera rápida (Estonba & Manzano, 2009). Muchos de los métodos actualmente utilizados resultan lentos y sus resultados se obtienen cuando ya no tienen validez, con lo cual se gasta tiempo y recursos en ensayos que quedarán abandonados. Por esto consideramos de vital importancia el desarrollo de herramientas que se ajusten a los requerimientos del mercado y la normativa.

1.3 La matriz: Queso de cabra

Las cabras fueron los primeros animales domesticados por el hombre (Alejandro Chacón, *com. pers.*), y tal vez a partir de ello fue descubierto el uso de leche para la alimentación humana. Este fue uno de los productos iniciales en ser sometidos a procesos fermentativos ya que sufre invasiones microbianas acidificantes con facilidad (Garibay *et al.*, 1993). Luego de elaborar leches fermentadas, el hombre comenzó con la producción de queso, desarrollando paralelamente el uso de la quimosina, una enzima coagulante de la leche (Rose, 1981; Kosikowski, 1988).

La FAO define al queso como un producto fresco o madurado que se obtiene por el drenado posterior a la coagulación de leche entera, crema, leche parcial o totalmente descremada o combinaciones de éstas (Scott, R., 1986). El queso más consumido a nivel mundial es el que se obtiene a partir de leche de vaca. Sin embargo, el queso de cabra es considerado un producto

de alto valor nutricional y sano, asociado a la alta digestibilidad y asimilación, ya que si bien la leche de cabra posee mayor contenido graso que la de vaca, sus glóbulos lipídicos son pequeños. Además esta leche presenta mayor cantidad de vitamina A, calcio, potasio, cobre, magnesio y fósforo en comparación con la de vaca. La leche de cabra contiene un alto porcentaje de ácidos grasos de cadena corta que intervienen en el sabor del queso, como butírico, caproico, cáprico y caprílico. Estos ácidos grasos le confieren al queso sabores diferentes y atractivos para los consumidores, reflejándose en la economía de los productores (Vega *et al.*, 2004).

En términos de salud, la leche bovina presenta caseína- α s1, que es la principal causa de alergia, mientras la leche de cabra presenta cantidades mínimas de dicha proteína en su composición, lo que genera que su estructura sea altamente hidratada, más abierta y menos firme. Esto facilita el tránsito del coágulo disminuyendo el tiempo de tránsito gástrico (Haenlein, 2002; Vega *et al.*, 2005), evitándose así que la lactosa esté un tiempo suficiente en el colon para su fermentación. Esto podría ser una de las razones por las cuales los consumidores presentan una mayor tolerancia a la leche caprina que a la bovina (Boyazoglu & Morand-Fehr, 2001; Haenlein, 2002; Richardson, 2004). Por otro lado, esta leche contiene un 1% menos de lactosa que la leche de vaca (Johnson, 1974), lo que en conjunto con su mayor digestibilidad la hace más tolerable.

Lo que comúnmente se conoce como “intolerancia a lactosa” es el resultado de la baja concentración de la enzima lactasa en el intestino, lo que ocurre en el 75-90% de las personas adultas (Peuhkuri, 2000; Renner, 1997; Sahi, 1994). Esto genera problemas en los niveles de ingesta de calcio en un alto porcentaje de la población mundial, ya que la leche de vaca (rica en calcio) y sus derivados no pueden ser consumidos por ellos. La reducción en la cantidad de lactosa presente es una manera de mejorar la calidad de estos alimentos para poder ser consumidos por la población. Por lo ya expuesto, la leche de cabra y sus derivados presentan una alternativa ideal para quienes presentan intolerancia a la lactosa y problemas digestivos.

En nuestro país hoy en día hay pocas marcas que comercializan queso de leche de cabra. Si bien la demanda está creciendo, no resulta sencillo acostumbrar el paladar a nuevos gustos (en muchos casos ácidos y fuertes), además de los elevados costos que limitan el consumo de estos quesos. En este último punto, es sabido que los productores intentan reducir los costos al máximo. En los meses de mayo a julio la producción de leche de cabra en Uruguay es escasa, y puede ocurrir que en esa época del año, los productores agreguen leche de vaca para poder

llegar a los niveles de producción adecuados para comercializar el producto de manera rentable (Aurora Ferreira, comunicación personal, 2013).

1.3.1 Manufactura del queso de cabra

Conocer el proceso de manufactura del queso nos puede dar una guía de dónde pueden estar los puntos de contaminación o adulteración del producto. Las etapas y aditivos utilizados dependerán del tipo de queso deseado (su textura, sabor, etc). Sin embargo, hay etapas claves que deben ser llevadas a cabo de manera obligatoria. Se detalla brevemente a continuación una información extraída y modificada de <http://bioteccaprina.inia.gob.ve>. Además, se obtuvo información de la entrevista realizada a Aurora Ferreira, una de las dueñas de la fábrica de los productos “Caprino Alto” comercializados en el mercado uruguayo y del curso de Microbiología de Lácteos (Facultad de Agronomía, UdelaR) a cargo de la Dra. Stella Reginensi.

1. Recepción de la leche: Las buenas prácticas de ordeño y la higiene del tambo son esenciales para evitar cualquier tipo de contaminación de la leche. Asimismo, debe tenerse en cuenta no utilizar cabras enfermas, desnutridas o cansadas para el ordeño, ya que no se extraerán buenas cantidades de leche, su calidad no será óptima y puede portar enfermedades (Dra. Stella Reginensi, *com. pers.*). La leche recién ordeñada debe ser sometida a un control de calidad que involucra pruebas de acidez y densidad de la misma, además de control de sus propiedades organolépticas. Luego se filtra para retener macro impurezas (PIEEP, 2005) e inmediatamente, debe ser llevada a tanques de frío a 4°C para su conservación (<http://bioteccaprina.inia.gob.ve>).

2. Pasteurización: Este proceso implica un calentamiento de la leche a 65°C durante 20 min (pasteurización lenta) para eliminar los microorganismos patógenos presentes y reducir aquellos no patógenos, pero que serán posibles competidores para los microorganismos lácticos que se agregarán posteriormente. Asimismo, este proceso destruye gran parte de las lipasas que pueden interferir en el proceso de elaboración del queso (op. cit.) y estabiliza las micelas de la leche. Seguidamente, la leche debe ser enfriada a una temperatura de aproximadamente 30°C (Dra. Stella Reginensi, *com. pers.*).

3. Incorporación de fermentos: La adición de bacterias lácticas colabora para que cuando se adicione el cuajo se forme el coágulo y se dé el desuerado debido a la producción de ácido por parte de estas bacterias (Sepúlveda & Dri, 2013). Además estas bacterias otorgan propiedades organolépticas particulares al queso. Este es uno de los puntos más importantes y críticos del proceso porque decide las características finales del queso (PIEEP, 2005).

4. Incorporación de aditivos: Se agrega CaCl_2 que contribuye a la acción del coagulante aumentando su rendimiento, y a la preservación de la leche que se mantiene durante un período prolongado en refrigeración. Además, ayuda a restablecer el calcio perdido durante la pasteurización (PIEEP, 2005). En este momento se puede agregar también algún condimento, como pimienta, ají, orégano, etc. para dar un gusto particular al producto.

5. Adición del cuajo: La temperatura ideal para agregar el cuajo es a 36°C . La cantidad de cuajo dependerá si es de uso comercial o si se extrajo del estómago de cabritos lactantes (Sepúlveda & Dri, 2013). Este contiene proteinasas que producen el corte de las κ -caseínas que se encuentran en la parte exterior de las micelas. Esto provoca un cambio en las cargas de las micelas y éstas comienzan a agregarse formando un entramado tridimensional de las proteínas de la leche que “atrapan” a los glóbulos de grasa formando un gel y endureciendo la leche en la tina (PIEEP, 2005). Una vez incorporado el cuajo, debe agitarse la leche por unos 5 min. Luego se deja reposar por 45 min hasta que se introduzca un cuchillo y este salga limpio (<http://bioteccaprina.inia.gob.ve>).

6. Corte de la cuajada: Consiste en cortar la cuajada con un marco metálico con mallas de hilos o con un cuchillo dentro del recipiente, en fragmentos iguales (en tiras o en cubos) y dejar reposar por 10 min, lo que permitirá que el suero se libere (<http://bioteccaprina.inia.gob.ve>, Sepúlveda & Dri, 2013). Una vez que la superficie se cubrió de suero, se debe agitar lentamente y pueden hacerse nuevos cortes con un posterior reposo para que se termine de liberar el suero.

7. Desuerado: Se separa la cuajada del suero con la ayuda de un colador.

8. Salado: La adición de sal puede llevarse a cabo en seco o en salmuera y dependerá del tipo de queso. La salmuera se prepara agregando 360 g de sal yodada por cada litro de agua y por cada 50 L de leche se mezcla 1 L de salmuera (<http://bioteccaprina.inia.gob.ve>). Para realizar quesos tipo crema el proceso se detiene en este paso (Aurora Ferreira, comunicación personal, 2013).

9. Moldeado: Se pasa la cuajada a un molde de madera o acero inoxidable y se deja prensado hasta el otro día. Es recomendable darlo vuelta durante los primeros 30 – 40 min para obtener un queso liso y de buen aspecto (Sepúlveda & Dri, 2013).

10. Maduración: El tiempo de maduración dependerá del tipo de queso que se quiera obtener, su textura y cuerpo. Los quesos de pasta blanda requieren una maduración corta, pero aquellos llamados “de corte” se dejan madurar más de 3 meses. Este procedimiento deberá

hacerse en el lugar fresco y con la higiene adecuada (Aurora Ferreira, comunicación personal, 2013).

Según se indica en el proceso de elaboración del queso, el único material génico adicional al de cabra presente es el bacteriano. Por tanto, no es de esperar que se encuentre ADN de ninguna especie animal en un queso puro de cabra.

La cantidad de ADN extraída de una muestra dependerá del número total de células somáticas presentes en ella (Rea *et al.*, 2001), que provienen de la leche utilizada para su manufactura. El número de células somáticas presentes en la leche se relaciona directamente con estado clínico del animal (Herman, 2001). Luego de todo el proceso de manufactura, que implica procedimientos físicos y químicos (ej. pasteurización y cuajado) es probable que el ADN haya sufrido degradación, por lo que deben utilizarse técnicas adecuadas para recuperar la mayor cantidad posible de ADN de buena calidad.

1.4 Adulteración de lácteos

En los alimentos procesados, generalmente de alto valor agregado, la sustitución de especies para obtener mayores ganancias es algo conocido desde el comienzo de su producción y comercialización (Fung *et al.*, 2001). En la mayoría de los países, los productos de consumo derivados de la leche deben especificar en las etiquetas el tipo de leche utilizada en su manufactura. En Uruguay, el artículo 13 del Decreto N° 174/002 del Reglamento Bromatológico Nacional señala que “los titulares de los establecimientos habilitados estarán obligados y serán responsables de utilizar etiquetas, rótulos o similares que hayan sido aprobados y registrados por la Autoridad Sanitaria Oficial (ASO), en la identificación de los productos elaborados”.

Debido a que el volumen de producción de leche de ovinos y caprinos en la mayoría de los países es mucho menor que la de vaca, existe un incentivo económico para la adulteración. Se requieren entonces, métodos de análisis para comprobar la posible presencia de leche de vaca en los productos que declaran estar manufacturados únicamente a partir de leche de oveja, cabra u otros (Ulberth, 2003). La sustitución de una especie por otra es algo relativamente sencillo, ya que tejidos de especies diferentes pueden llegar a ser similares en apariencia, y una vez incorporados a un producto procesado, las pequeñas diferencias existentes se pierden casi por completo.

Estas prácticas pueden generar problemas sanitarios, de salud y hasta culturales, ya que por ejemplo, quienes eligen consumir quesos de cabra, pueden hacerlo debido a su incapacidad de consumir otro tipo de quesos, por afecciones de salud o motivos religiosos. Por lo que (en caso de una adulteración) se estaría engañando al consumidor, que en buena fe confía en el proveedor del producto que le indica la composición del alimento. Por otro lado, la competencia desleal plantea una traba para el mercado, reforzando la necesidad de la existencia de mecanismos analíticos de contralor.

1.4.1 Evaluación de los componentes de una matriz alimentaria

Siempre que se establece una normativa, el Estado debe contar con los mecanismos necesarios para hacer cumplir dicha resolución. En este caso, debe ser posible identificar si un producto manufacturado posee realmente los componentes que dice su etiqueta.

Se han desarrollado distintas estrategias moleculares para la identificación de los componentes de una matriz alimentaria, como lo son las cromatografías (HLPC, GC, GC-MS, GC-FTIR), espectroscopias (UV, IR), resonancia magnética nuclear (NMR), absorción atómica (AAS/AES, ICP-AES, ICP-MS) y espectrometría de masas (IRMS, GC-IRMS, GC-C-IRMS), entre otras (Cordella *et al.*, 2002). Sin embargo, otras técnicas más modernas basadas en el estudio del ADN y proteínas permiten la identificación de especies en diferentes matrices alimentarias, incluyendo alimentos procesados como los utilizados en el presente trabajo. Originalmente, estos métodos se basaban en la cantidad de proteínas presentes y las diferencias en su composición molecular mediante ensayos electroforéticos e inmunológicos (Marmioli *et al.*, 2003; Ulberth, 2003). Actualmente, la Comunidad Europea emplea como método de referencia para hallar presencia de leche de vaca, el isoelectroenfoque (IEF) de la β -caseína (Commission Regulation, 1996).

Las alternativas al abordaje analítico con proteínas, son los ensayos de trazabilidad basados en el ADN, que presentan varias ventajas con respecto a aquellos. Entre ellas está la estabilidad estructural del ADN a altas temperaturas, y la posibilidad de permitir una identificación absolutamente precisa mediante el secuenciado nucleotídico. Además, el ADN puede extraerse de la mayoría de los tejidos tanto vegetales como animales, y permanece prácticamente inalterado a través de todo el procesamiento de los alimentos. Si bien durante la esterilización por calor el ADN es degradado (como en el proceso de envasado de algunos alimentos), los fragmentos remanentes son suficientes para su posterior estudio.

Por consiguiente, la identificación basada en el ADN obtenido a partir de tejidos animales provenientes de productos manufacturados, constituye la herramienta de elección para llevar a cabo el presente trabajo. La técnica más utilizada en la actualidad para la detección específica de secuencias de ADN es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que se detalla más adelante.

1.5 Organismos genéticamente modificados

1.5.1 ¿Qué son?

Los organismos genéticamente modificados (OGMs) son aquellos a los que se le ha agregado uno o más genes por técnicas de ingeniería genética, con el objetivo de incorporar nuevas características deseadas, como puede ser la resistencia a insectos o tolerancia a sequía en el caso de los vegetales (ChileBio, 2013).

Si bien recién en el año 1973 Cohen y Boyer consiguen “cortar” un gen de un organismo e introducirlo en otro, la humanidad ha cruzado variedades y creado nuevas plantas desde antes del año 4000 A.C.. En la antigüedad los agricultores seleccionaban semillas de las mejores plantas para sembrarlas y obtener mejores cultivos en el siguiente año; a comienzos del siglo XVIII, se crea la primer planta híbrida en Europa y en 1908 se produce el primer maíz híbrido por autopolinización (ChileBio, 2013).

Han pasado 6000 años desde que el hombre comenzó a modificar la naturaleza para obtener provecho y recién hace 31 años se produjo el primer cultivo genéticamente modificado (planta de tabaco resistente a un antibiótico). Debemos tener en claro, entonces, que la modificación por ingeniería genética de una planta no es la única manera de generar cambios en ella, pero sí resulta el mecanismo más estudiado hoy en día (OMS, 2002).

1.5.2 Situación mundial

Actualmente hay más de 30 países con eventos genéticamente modificados aprobados, para distintos usos. En 1996, cuando se introdujo el primer cultivo transgénico, había plantadas 1.7 millones de hectáreas, en 2012 el número ascendía a 170 millones de hectáreas a nivel mundial. En el último año, los países en desarrollo superaron a los países desarrollados en su implementación, con un 52% de los cultivos totales según el International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA, 2013). Estos datos nos hacen pensar en la importancia que están tomando este tipo de cultivos a nivel mundial y el impacto que esto tiene en la producción de alimentos.

Por primera vez, en 2011, los 10 países con mayor superficie cultivada con este tipo de cultivos sobrepasaron cada uno el millón de hectáreas plantadas (en orden decreciente): EEUU (69.0 millones de Has.), Brasil (30.3), Argentina (23.7), India (10.6), Canadá (10.4), China (3.9), Paraguay (2.8), Pakistán (2.6) y Sudáfrica (2.3). Nuestro país no ha sido la excepción, Uruguay plantó 1.3 millones de hectáreas de cultivos transgénicos de soja y maíz en 2011 (ISAAA, 2012).

Hoy en día hay 28 cultivos que están modificados genéticamente y que se plantan en alguna parte del mundo. Los principales son, en orden decreciente: soja, maíz, algodón y canola (ISAAA, 2012). Los procesos de aprobación de un evento son exhaustivos y se realizan en cada país donde el evento quiere ser implementado, tanto sea para consumo directo, para siembra o comercialización. El proceso que deben seguir los cultivos transgénicos se llama “evaluación de riesgo” y se basa en un enfoque comparativo, aplicando el llamado “principio de equivalencia sustancial” y se toma cada caso como independiente (ChileBio, 2011). Algunos de los puntos a tener en cuenta para la evaluación de riesgo según el Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio) son:

- El origen del gen foráneo.
- La caracterización molecular de la construcción.
- El modo de acción del gen.
- Niveles, patrones y estabilidad de la expresión del gen en el OGM.
- Características moleculares de la inserción.
- Historia del uso seguro del gen.
- Toxicidad y alergenicidad del producto de expresión del gen.
- Impacto ambiental del OGM.
- Características morfológicas, fisiológicas y agronómicas del OGM
- Características nutricionales del OGM

Los cultivos genéticamente modificados son sin duda los más estudiados y los que se encuentran sometidos a la mayor cantidad de estudios previo a su cultivo y utilización.

Protocolo de Cartagena

El Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica es un tratado internacional puesto a punto finalmente en el año 2000 (entrado en vigor internacional el 11 de setiembre de 2003) que tiene como objetivo proporcionar un marco normativo para conciliar las necesidades del comercio y del medio ambiente de la industria biotecnológica; así como garantizar la protección adecuada de la transferencia, manipulación y utilización de Organismos Vivos Modificados (OVMs) resultantes

de la biotecnología moderna, centrándose en la regulación del movimiento transfronterizo de dichos organismos. Uruguay ratificó el tratado el 12 de agosto del 2011 por la ley N° 18.792, entrando en vigor el 31 de enero de 2012, convirtiéndose en el país parte N° 158.

El Protocolo se aplica a los OVMs que serán introducidos en el medio ambiente y a aquellos destinados para consumo directo humano o animal, o para procesamiento y a materiales procesados que tengan su origen en un organismo vivo modificado, que contenga combinaciones nuevas detectables de material genético replicable. Sin embargo, no contempla los OVMs que son productos farmacéuticos que ya están contemplados en otros acuerdos.

Este tratado vincula la legislación de los países involucrados y establece la necesidad de la evaluación de riesgo basada en procedimientos científicos sólidos como requerimiento para cualquier intercambio transfronterizo. Además, contempla el principio de precaución, que indica que “cuando exista peligro de daño grave o irreversible, la falta de certeza científica absoluta no deberá utilizarse como razón para postergar la adopción de medidas eficaces para impedir la degradación del medio ambiente” basado en el principio 15 de la declaración de Río de Janeiro de 1992.

Si bien el Protocolo deja a criterio de las Partes el etiquetado de productos genéticamente modificados dentro de su territorio, sí exige el etiquetado de los *containers* o recipientes que van a hacer movimientos transfronterizos con contenidos de organismos vivos genéticamente modificados.

1.5.3 Uruguay

En el año 1996 se introdujo en Uruguay el primer evento transgénico para cultivos de soja (MON 40-3-2, o soja RR) que confiere tolerancia al herbicida glifosato. En los años 2003 y 2004 se aprobaron los eventos MON810 y Bt11 de maíz Genéticamente Modificado (GM), respectivamente, con resistencia a lepidópteros, para siembra, consumo y comercialización. En los años 2009 y 2010, la Comisión para la gestión del Riesgo del Gabinete Nacional de bioseguridad del MGAP comenzó a evaluar más de doce eventos con distintas características para cultivos de maíz y soja. Para fines del 2012 ya se había aprobado la liberación de nueve nuevos eventos para maíz (eventos GA21, TC1507, NK603, MON810 X NK603, GA21 X Bt11, MON89034 X NK603, TC1507 X NK603, MON89034 X TC1507 X NK603 y Bt11 X Mir162 X GA21) y tres para soja (eventos A5547-127, MON89788 X 87701 y A2704-12) (*Figura 1*), todos para cultivo directo, procesamiento o uso comercial.

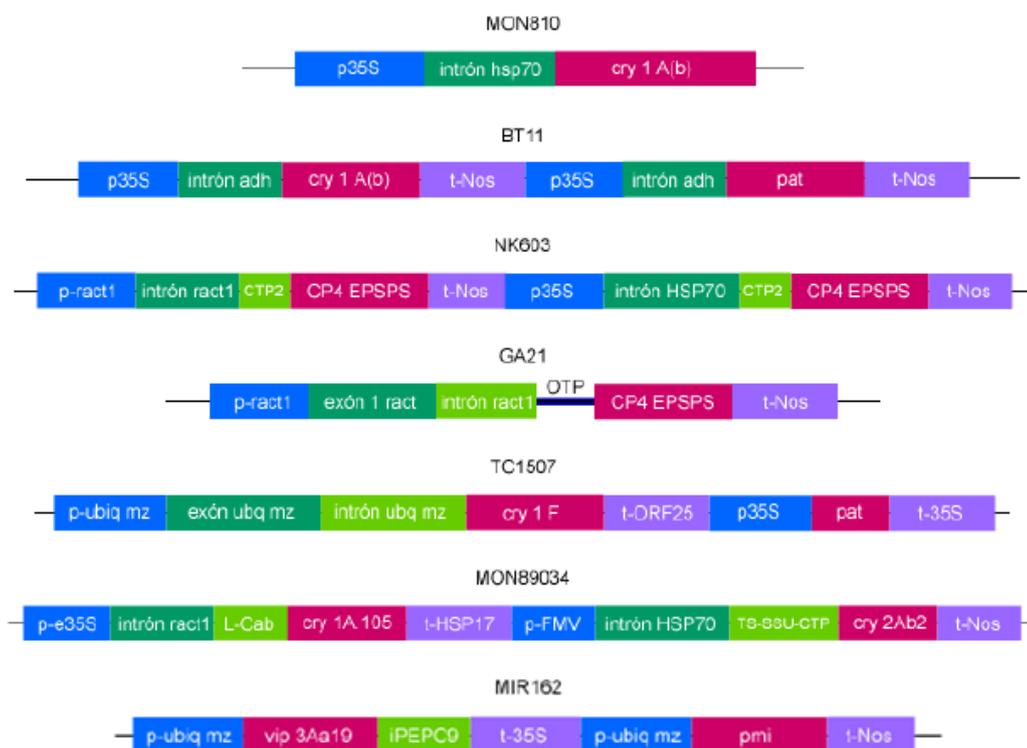


Figura 1. Representación de las construcciones de los eventos de maíz aprobados (MON810, Bt11, GA21, TC1507, NK603, MON810 X NK603, GA21 X Bt11, MON89034 X NK603, TC1507 X NK603, MON89034 X TC1507 X NK603 y Bt11 X Mir162 X GA21) hasta el momento en Uruguay. En la imagen se muestran los eventos por separado, para los eventos apilados se utilizan las mismas construcciones pero de forma combinada.

Referencias: **p35S** (promotor 35S virus mosaico del coliflor), **p-e35S** (promotor 35S del virus del mosaico del coliflor) **intrónhsp70** (intrón hsp70 de maíz), **cry 1 A(b)** (delta-endotoxina cry1Ab de *B. thuringiensissubsp. kurstaki*), **intrónadh** (intrón del gen 1S de la enzima alcohol deshidrogenasa de maíz), **t-Nos** (terminador del gen nopalinsintasa de *Agrobacteriumthumefasiens*), **pat** (gen que codifica para la enzima fosfoinotricin-acetil transferasa de *Streptomycesviridochromogenes* cepa Tu494), **ract1** (gen de actina de arroz), **CTP2** (péptido de tránsito al cloroplasto de *A. thaliana*), **CP4 EPSPS** (proveniente de *A. tumefaciens*, codifica para la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato 3-fosfato sintetasa), **ubiqmz** (gen de ubiquitina de maíz), **cry 1 F** (delta-endotoxina cry1F de *B. thuringiensis*), **t-ORF25** (secuencia ORF25PolyA de *Agrobacteriumtumefaciens*), **L-Cab** (región 5' no traducida de la proteína de unión a la clorofila a/b de trigo), **cry 1A.105** (delta-endotoxina artificial que consta de los dominios I y II de *Cry1Ab* o *Cry1Ac* (ambas proteínas muestran un 100% de similitud en la secuencia de los dominios I y II), dominio II de la *Cry1F* y la porción c-terminal de la *Cry1Ac*), **t-HSP17** (secuencia 3' de terminación de la transcripción para la proteína de golpe de calor del trigo 17.3), **p-FMV** (promotor del virus del mosaico del higo), **TS-SSU-CTP** (región de ADN que contiene la secuencia de acceso para la región del péptido de tránsito al cloroplasto de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa del maíz y el primer intrón), **cry 2Ab2** (secuencia codificante de la proteína *Cry2Ab2* de *B. thuringiensis* que emplea codones modificados), **vip 3Aa19** (delta-endotoxina producida por *B. thuringiensis* durante su etapa vegetativa de crecimiento), **iPEPC9** (intrón #9 del gen fosfoenolpiruvatocarboxilasa de maíz), **t-35S** (terminador del gen 35S del virus del mosaico del coliflor), **pmi** (gen *pmi* de *E. coli* que codifica para la fosfomanosaisomerasa).

(tomado de la Tesina de Grado de Martín Fernández, 2010).

El Decreto 353/008 que rige sobre los vegetales GM, ha establecido la “coexistencia regulada” entre vegetales GM y no-GM como política a aplicar en relación a la liberación de los mismos. Sin embargo, la resolución N° 53 del 19 de setiembre de 2012 establece que para los cultivos de maíz específicamente, se elimina la implementación obligatoria de un “área de refugio” (maíz genéticamente no modificado) tras análisis de riesgo realizados. En la zafra 2010/2011 aproximadamente el 90% del maíz sembrado en nuestro país fue genéticamente modificado (unas 94.500 hectáreas).

Nos consta que existe un interés explícito de varios sectores de la población civil y del Laboratorio de Bromatología de la Intendencia de Montevideo (LB-IMM), a través de un Convenio vigente de cooperación y transferencia tecnológica entre nuestro laboratorio de la Facultad de Ciencias y la IMM, de conocer el status (en cuanto a su transgenicidad) de los alimentos de consumo masivo locales. Es por esto que consideramos de gran importancia el implementar métodos para responder a dicha inquietud, y dotar a los organismos oficiales de contralor de herramientas que les permitan cumplir con sus objetivos primarios, garantizando la seguridad alimentaria de la población.

En países como Australia, Brasil, China, Japón, Rusia y los de la Unión Europea, entre otros, ya existe desde hace varios años una legislación que obliga al etiquetado de alimentos transgénicos. En Uruguay, el Decreto 353/008 en el Art. 4º.- (Etiquetado) establece que “El Gabinete Nacional de Bioseguridad (GNBio) promoverá acciones tendientes a la implementación del etiquetado voluntario "GM" o "no GM", aplicable a aquellos alimentos en los que se pueda comprobar mediante análisis del producto final la presencia de ADN o proteínas genéticamente modificados”. Hoy en día hay un fuerte movimiento por parte de la población, sobretudo en Montevideo, para promover un decreto que obligue el uso de etiquetas en alimentos de origen transgénico, impulsado por la regulación europea que garantiza la trazabilidad y el etiquetado de los OGM y de los productos obtenidos a partir de dichos organismos a lo largo de la cadena alimentaria (Diario Oficial UE, 2003). En este marco, de aprobarse el decreto, serán necesarias herramientas para controlar su cumplimiento.

Debido a que en nuestro país el maíz cultivado, en su amplia mayoría, es genéticamente modificado, es probable que el almidón de maíz que contienen los quesos de cabra locales provenga de maíz transgénico. Asimismo, el análisis de quesos provenientes del mercado mexicano nos permitirá detectar la presencia de este tipo de maíz en alimentos que se consumen en un país donde 52 eventos de maíz han sido aprobados para consumo como alimento procesado pero no para su cultivo (ISAAA, 2013).

1.6 Detección de especies y transgénicos a partir de ADN

Como norma general, la adición de un método de trazabilidad de un producto a un sistema de inspección y certificación de alimentos debe ser de carácter práctico y viable a nivel técnico y económico (Codex Alimentarius, 2006). En esta línea, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica rápida que se basa en la amplificación de ADN de manera exponencial para su posterior análisis a partir de trazas del mismo (Saiki, 1985). Es, sin embargo, una técnica costosa en infraestructura de partida (por el equipamiento, reactivos y recursos humanos capacitados) y dada su gran sensibilidad requiere un lugar de trabajo debidamente diseñado para evitar contaminación por producto previamente amplificado. Además, es fundamental que el ADN utilizado este libre de inhibidores que puedan interferir con la técnica (Rossen *et al.*, 1992).

Existen tres factores principales que determinan el éxito de la PCR. Estos son: la cantidad de ADN extraído, la calidad (la cual se relaciona con la cantidad de daño que ha sufrido el ADN durante los pasos de procesamiento del alimento antes de la purificación) y la pureza (la cual refleja la cantidad de contaminantes co-purificados con el ADN) (Griffiths *et al.*, 2002).

Esta técnica presenta múltiples variantes según el objetivo a alcanzar. En este trabajo se realizará PCR con cebadores específicos para poder amplificar fragmentos de ADN que nos indiquen la presencia de las especies animales a estudiar.

Para el análisis de transgénicos, existen cuatro niveles de especificidad (rastreo, específico de gen, específico de construcción y específico de evento) bajo los cuales se puede trabajar y dependerá de qué es lo que se quiere identificar, los cebadores que serán utilizados (Miraglia *et al.*, 2004; Holst-Jensen *et al.*, 2003). En este caso, nos centraremos únicamente en el nivel de rastreo (ver *Figura 2*).

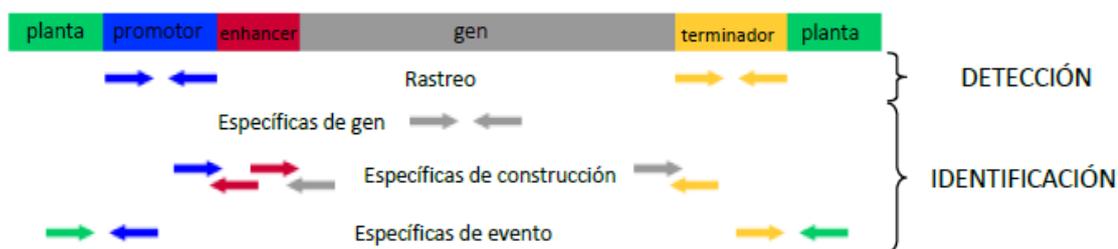


Figura 2. Categorías de ensayos de PCR según el blanco a analizar marcada sobre una construcción de un evento transgénico tipo. De arriba hacia abajo se muestran las estrategias en grado creciente de especificidad. (tomado de la Tesina de Grado de Martín Fernández, 2010).

¿Qué ADN utilizar?

Hoy en día, se busca utilizar ADN en alto número de copias, como el ADN mitocondrial o cloroplástico (en animales y vegetales respectivamente). Para la diferenciación entre especies animales, la utilización de ADN mitocondrial es la opción más acertada, ya que ha acumulado aproximadamente 10 veces más mutaciones por generación que el ADN nuclear (lo que implica una mayor variación genética) (Pesole *et al.*, 1999). El mismo está presente en cientos de copias por célula (Lenstra, 2003; Robin & Wrong, 1988) y presenta un carácter haploide que permite la identificación sin ambigüedades de especies e incluso de individuos dentro de la misma especie (Marmioli, 2003). Específicamente, se ha demostrado que las secuencias de *citocromo b* difieren al menos en unos pocos nucleótidos entre una especie y otra aunque estén muy emparentadas (Martin & Palumbi, 1993), lo que hace de este gen un blanco ideal para nuestro estudio de detección de especies.

Para la detección de OGMs, la secuencia a utilizar dependerá del nivel al que se desee trabajar, como se indicó en el apartado anterior.

1.7 Antecedentes

En el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de la Facultad de Ciencias se han desarrollado métodos que permiten la detección de especies en alimentos procesados (*Figura 3*). Por ejemplo el Método de Determinación de Especies Animales en Alimentos (*MeDeA*) (Patente de Invención Nº 28351, 2005, titulares: R. Ehrlich y C. Martínez Debat), permite determinar trazas de especies animales en alimentos manufacturados derivados de la carne u otros tejidos animales. Es un método económico, rápido, muy sensible y exacto, que en la actualidad detecta inequívocamente las siguientes especies: pollo, caballo, oveja, cerdo y vaca. Este método ha sido validado mediante la secuenciación nucleotídica automatizada de los productos de amplificación obtenidos. Este será el método utilizado, con las optimizaciones necesarias para la matriz alimentaria problema, para cumplir con los objetivos establecidos por este proyecto (ver apartados 2 y 3) en cuanto a la detección de especies animales.

Para el caso de especies vegetales, su identificación ha sido tradicionalmente más problemática. En las plantas, no existe aún un marcador de identidad consensuado, aunque se han postulado varios, entre los cuales se destacan algunas secuencias cloroplásticas (*rbcl*, *trnH-psbA*, *atpF-H* y *matK*) y otras nucleares como *hmgA* que será utilizada en este trabajo para la identificación de maíz. Se desaconseja la utilización de secuencias mitocondriales, debido a que la tasa de sustitución nucleotídica mitocondrial es mucho menor que en animales (Taberlet *et al.*, 1992; Chase *et al.*, 2007), pero sí podrían utilizarse secuencias cloroplásticas.

En nuestro laboratorio estamos implementando el método Determinación de Especies Vegetales en Alimentos (*DeVa*), que nos permitirá cumplir con los objetivos planteados en la sección siguiente de este trabajo. Además, como complemento de DeVa se amplificarán las secuencias del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor y el terminador de la nopalina sintasa (t-Nos) utilizadas en las construcciones insertas en vegetales genéticamente modificados.

2 OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de este trabajo es contribuir con el desarrollo de nuevas herramientas para la trazabilidad de alimentos mediante la utilización de métodos moleculares. Se busca que dichas herramientas sirvan a los organismos de contralor para detectar e identificar la presencia de especies animales y especies vegetales genéticamente modificadas en matrices alimentarias. En este trabajo se trabajará con queso de cabra como matriz problema.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos se plantean:

1. Extraer ADN de buena calidad y alta pureza tanto de los controles como de las muestras problema obtenidas en los mercados uruguayo y mexicano.
2. Poner a punto la técnica de PCR en cada estrategia planteada, para ser utilizada de manera adecuada con las muestras problema.
3. Detectar e identificar mediante PCR la presencia de ADN de cabra y/o vaca y maíz genéticamente modificado en los ADNs obtenidos en el punto 1.
4. Comprobar que la Estrategia 2 (ver punto 4.1), utilizada para detección de especies animales, es un método válido para realizar este tipo de abordajes.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia general utilizada

La estrategia utilizada para cumplir con los objetivos planteados se muestra a continuación en la *Figura 3*. Esta se diagramó a partir de los métodos desarrollados en nuestro laboratorio para detección de especies animales y vegetales (ver punto 1.3).



Figura 3. Esquema de las estrategias utilizadas para detección de especies animales (izquierda) y análisis de transgenicidad (derecha).

4.2 Obtención de ADN control

Todas las muestras para controles fueron transportadas al laboratorio desde su lugar de origen y mantenidas a -20°C hasta su utilización, menos en el caso de las muestras de sangre, que se almacenaron a 4°C .

1. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE DE CABRA:

Se tomaron 3 muestras de sangre de cabra: sangre con heparina, sangre con EDTA y sangre pura (todas proporcionadas por el Dr. Claudio Borteiro, Fac. Veterinaria, UdelaR). Se utilizaron 2 métodos de extracción para cada muestra.

Método 1. Se siguió el protocolo establecido en Dneasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany).

Método 2. Se utilizó una técnica empleada de manera rutinaria en nuestro laboratorio denominada "Micrométodo de proteinasa K modificado". Para llevarla a cabo, se siguió el siguiente protocolo: se tomaron 0,5mL de sangre y se le agregó buffer de lisis de glóbulos rojos compuesto por Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM y NaCl 10 mM hasta completar 1,4 mL de volumen final. Se centrifugó por 2 min a 9.700 g, 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 centrifugó nuevamente hasta obtener el precipitado de glóbulos blancos. A continuación se procedió a extraer el ADN comenzando con una disgregación del precipitado por agitación leve con 0,270 mL de buffer de lisis de glóbulos blancos, que consiste en Tris-HCl 10 Mm pH 8, EDTA 10 mM pH 8, NaCl 50 mM y SDS 0,2%. 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 durante toda la noche. Pasada dicha incubación, se le agregaron 380 µL de NaCl 5 M, se agitó en vortex durante 30 segundos y se centrifugó a 12.300 g por 30 min. Se extrajeron 500 µL de sobrenadante y se colocaron en otro tubo. Luego se le agregaron dos volúmenes de etanol 100% por las paredes del tubo y se invirtió 5 veces con una posterior centrifugación a 9,7 g durante 5 min, y se descartó el etanol. Luego se le agregaron 250 µL de EtOH 70% al precipitado, se centrifugó a 9.700 g por 5 min y se descartó el sobrenadante. Esto se realizó dos veces. Después se secaron los tubos mediante el Vacuo Secador Rotatorio (*Speed Vac SC100 Savant with a Refrigerated Condensation Trap RT100 Savant*) en frío durante 3 min. Luego se agregaron 100 µL de agua mQ, se dejó resuspendiendo con hielo en la heladera durante 10 horas y finalmente se resuspendió por tres minutos a 68°C.

2. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE LECHE DE CABRA:

La muestra utilizada se obtuvo en un comercio del ramo en Montevideo. Para su extracción se utilizó el método descrito por Dalmaso *et al.*, 2011, cuyo protocolo es que siguiente: se centrifugó 1mL de leche pura de cabra a 1.500 g durante 15 min para colectar las células somáticas. Los pellets fueron resuspendidos tres veces en 1 mL de PBS 1X, centrifugados a

12.000 g por 5 min y resuspendidos finalmente en 200 μ L de PBS 1X. El ADN fue luego extraído siguiendo el protocolo de Dneasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany).

3. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE UNA MUESTRA DE RIÑÓN DE OVEJA:

Se tomó una muestra de un riñón de cordero, donado por un productor uruguayo. Se siguió el protocolo establecido por Dneasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany).

4. CONTROLES DE VACA Y DE MAÍZ TRANSGÉNICO:

Fueron proporcionados por el Dr. Claudio Martínez Debat, tutor de este trabajo. Estos consisten en el ADN genómico de vaca extraído a partir de sangre de vaca y ADN genómico de maíz transgénico obtenido a partir de material de referencia certificado por el IRMM.

Obtención de ADN de quesos problema

Las muestras de queso analizadas fueron obtenidas de comercios del ramo, tanto en Uruguay como en México y estaban todas vigentes al momento de realizar la extracción de ADN (ver *Tabla 1*). La extracción de su ADN se realizó mediante un método basado en la descripción de Dellaporta *et al.* (1983) al que se le agregó un paso de Proteinasa K para degradar las proteínas presentes en la matriz y luego un paso de desproteización con cloroformo : alcohol isoamílico (24:1) para extraer las proteínas desnaturalizadas, a fin de lograr un mayor rendimiento en la extracción, al que denominamos “Método Dellaporta modificado”.

Tabla 1. Descripción de las muestra de queso obtenidas en el mercado uruguayo y mexicano.

Código de muestra	Origen	Especies declaradas
LCH	Uruguay	Cabra
LP	Uruguay	Cabra
CA	Uruguay	Cabra
CB	México	Cabra
QT	España	Cabra / Oveja / Vaca
QTB	México	Cabra
UN	Uruguay	Vaca

4.2.1 Descripción del método de extracción de ADN para quesos:

Se pesaron 250 mg de muestra a los que se le agregaron 1 mL de buffer de extracción compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, SDS 1% y β -mercaptoetanol 10 mM. Luego de mezclar bien se agregaron 10 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) y se dejó incubando a 65°C por 30 min agitando cada 5 min.

Después se le adicionaron 500 μ L de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión 100 veces con una posterior centrifugación a 9.700 g por 5 min. Luego, se tomó 1 mL del sobrenadante al que se le agregaron 300 μ L de acetato de potasio 5M, y se mezcló por inversión 5 veces antes de dejar incubando en hielo por 10 min.

Se procedió a una centrifugación a 9.700 g por 20 min y posteriormente se tomó 1mL del sobrenadante al que se le agregó un volumen igual de isopropanol que fue mezclado por inversión 10 veces. Se centrifugó una vez más a 9.700 g por 20 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue lavado con 400 μ L de etanol 70%. La mezcla se centrifugó a 9.700 g por 5 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se secó en *Speed Vac* por 3 min para luego resuspenderlo en 100 μ L de H₂O mQ y dejarlo toda la noche en hielo.

4.3 Cuantificación del ADN obtenido

La cuantificación del ADN que se obtuvo tanto de las muestras problema como de las muestras control fue hecha con *Nanodrop Thermo Scientific ACTGen 3700*. En el mismo es necesario colocar 1 μ L de muestra y el software arroja datos de la concentración del ADN en dicha muestra (utilizando la relación $A_{260} = 1 \text{ OD ADN} = 50 \mu\text{g/mL}$) y de la pureza del mismo, al dar la relación A_{260}/A_{280} . La mayoría de las proteínas presentan un máximo de absorbancia a 280 nm debido a la presencia de aminoácidos aromáticos, por tanto al hacer la relación A_{260}/A_{280} podemos establecer que tan puro está el ADN extraído (se toma como ADN puro si el cociente es mayor a 1,8).

4.4 Estimación de la integridad del ADN extraído

Para detectar la integridad del ADN de los controles y de las muestras problema se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE 1X, utilizando el Marcador de Peso Molecular 1kb DNA ladder (Biolabs), por una hora a 100 V aproximadamente.

Su visualización se realizó exponiendo el gel a un transiluminador UV, que permite la visualización del Gel Red (previamente adicionado al buffer de carga) intercalado entre las bases del ADN.

4.5 Amplificación por PCR

Higiene previa

Se tomaron las precauciones necesarias para evitar cualquier tipo de contaminación en cualquiera de los pasos. Para esto se utilizaron áreas diferenciales para las distintas etapas de la técnica: una zona donde las muestras fueron preparadas, una zona de preparación del mix de PCR, una zona para adición del ADN problema y una zona para la realización de electroforesis. Todas las áreas fueron debidamente descontaminadas previo a su utilización con Hipoclorito de sodio 10%, EtOH 70% y agua destilada.

Puesta a punto de la técnica

Para la puesta a punto de la PCR se utilizaron los ADN controles de vaca y de cabra extraídos como se explica en el apartado 4.2. Las pruebas fueron realizadas en termociclador *Axygen MaxyGene Gradient*, con el cual se pueden probar varias temperaturas de hibridación de cebadores (T_m) en la misma reacción de PCR.

El programa de ciclado utilizado finalmente para cada par de cebadores, se detalla en el apartado 4.6.1.

4.5.1 Detalle de la metodología utilizada:

A. Detección de especies animales

Se llevaron a cabo dos estrategias para la detección de ADN bovino y caprino en los quesos de cabra estudiados. Ambas están basadas en la amplificación por PCR de regiones conservadas del genoma de ambas especies, como es el gen del *citocromo b (cytb)* presente en el ADN mitocondrial.

Controles positivos y negativos

En cada reacción de PCR se utilizó un control positivo conteniendo ADN puro de la especie correspondiente y los cebadores pertinentes en cada ocasión, bajo las mismas condiciones que el resto de las muestras. Los controles negativos contenían los mismos componentes que el resto de los tubos de la reacción, a excepción del ADN, para poder comprobar que no existía contaminación.

Procedimiento

Para ambas estrategias utilizadas, las reacciones fueron llevadas a cabo en 25 μ l totales conteniendo: 100 ng ADN genómico (de 1 a 3 μ l), 2,5 μ l Buffer 10X, 1,5 μ l $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ l de cada cebador 10 mM, 0,25 μ l dNTPs 10 mM, 0,25 μ l Taq ADN polimerasa HybriPol 5 u/ μ l (Bioline) y agua csp. 25 μ l. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador *Axygen MaxyGene Gradient* que se programó para realizar una desnaturalización inicial a 94° por 4 min, seguida de 33 ciclos: 94° por 30 s, 63° por 30 s y 72° por 30 s. Por último una extensión final a 72° por 7 min.

Los cebadores utilizados fueron distintos según la estrategia utilizada. Ambas se detallan a continuación.

ESTRATEGIA 1. Se utilizó en primer lugar el método de detección de especies animales propuesto por Matsunaga (Matsunaga *et al.*, 1999) en el cual se amplifica un fragmento del gen de *cytb* a partir de un cebador directo universal y cebadores reversos específicos, lo que da lugar a amplicones de distinta longitud según la especie (y por tanto distinto peso molecular); esto permite discriminar la presencia de las diferentes especies, mediante una posterior electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se detalla a continuación (*Tabla 2*) los cebadores utilizados y en la *Tabla 4* se indica el tamaño de los amplicones obtenidos para cada especie. Se ilustra en la *Figura 4* la secuencia blanco de cada cebador. En las tablas donde se indican las secuencias utilizadas se señalan dos T_m, una de ellas es la que da el proveedor y la otra fue obtenida mediante la fórmula T_m = 2(A+T) + 4(G+C) (Wallace *et al.*, 1979).

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados en la Estrategia 1 (Matsunaga *et al.*, 1999).

Referencias: * : No especificado por el proveedor.

NOMBRE	SECUENCIA	T _m proveedor	T _m (Wallace <i>et al.</i> , 1979)
Fsim	5'-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3'	70,0°C	106°C
RK	5'-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3'	61,8°C	78°C
RG	5'-CTCGACAAATGTGAGTTACAGAGGGA-3'	*	76°C

SIM GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA

G CTTGGATCCCTCCTAGGAATTTGCCTAATCTTACAAATCCTGACAGGCCTATTCTAGCAATACACTATACATCCGACACA

B TTTCGGTTCCCTCCTGGGAATCTGCCTAATCTTACAAATCCTCAGGCCTATTCTAGCAATACACTATACATCCGACACA

G ATAACAGCATTCCCTCTGTAACCTACATTTGTCGAGATGTAAATATGGCTGAATCATCCGATACATACACGCAACGG..... CACATACATCGGA

B ACAACAGCATT..... ACGTGAACCTACGGCTGAATCATCCGATACATACACGCAACGG..... ATATGCAGTAGGA

G CGAGGTC..... AAACATGAAACATTGGAGTAATCCTCCTGCT..... GCTATGTTTTACCATGAGGACAAATATCA

B CGAGGCTTATATTACGGGCTTACACTTTTCTAGAAACATGAAATATTGGAGTAATCCTTCTGCTAGT..... GATACGCTCCTACATGAGGACAAATATCA

Figura 4. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados en la Estrategia 1 y su secuencia blanco. Los puntos y las cajas negras indican los sitios idénticos y diferentes a la secuencia del cebador, respectivamente. Los marcos encuadran las secuencias del cebador SIM y los reversos específicos de especie para cabra (G) y vaca (B).

(Adaptado de Matsunaga *et al.*, 1999).

Reacción cruzada

Debido a la posibilidad de que los cebadores de cabra de la Estrategia 1 (Fsim – RG) pudieran estar amplificando ADN de oveja, se procedió al análisis bioinformático de la situación para descartar que los resultados positivos arrojados por el par de cebadores Fsim – RG pudiera ser producto de la amplificación de ADN ovino.

El estudio se realizó utilizando secuencias de ADN de oveja obtenidas de la base de datos GenBank perteneciente al NCBI (National Center for Biotechnology Information). El programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) se utilizó para el alineamiento de los cebadores Fsim – RG con la secuencia problema.

ESTRATEGIA 2. Previamente en el laboratorio se ha estudiado de forma teórica la modificación de los cebadores reversos específicos propuestos por Matsunaga (únicamente para vaca y cabra, Matsunaga *et al.*, 1999) con el objetivo de crear cebadores directos y reversos específicos que puedan ser utilizados en la detección de especies y para la cuantificación de ADN de cada especie mediante PCR en Tiempo Real (Tesina de grado Agustín Miller, 2011). En este trabajo, los cebadores obtenidos en aquel estudio fueron utilizados para detectar la presencia de ADN de vaca y ADN de cabra en las muestras problema.

En la *Tabla 3* se indica la secuencia de cada cebador utilizado únicamente en la Estrategia 2. En la *Tabla 4* se indica el tamaño de los amplicones obtenidos para cada especie.

Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados en la Estrategia 2, diseñados por nuestro laboratorio.

NOMBRE	SECUENCIA	Tm	Tm (Wallace <i>et al.</i> , 1979)
RGF/K	5'-CCTCTCTTACCCATATCTGCCGAGAC-3'	66,4°C	80°C
RK1	5'-CATATATAAGCAGATAAAAAACATTGAAG-3'	56,8°C	68°C
RGF	5'-TTTCCTCTGTAAACATTTGTCGAG-3'	61,9°C	66°C
RK/G	5'-CTAGAAAGGTATATGATCCATAATATAGAC-3'	59,9°C	78°C
RG1	5'-GAATAGGCAGATAAAGAATATTGATG-3'	56,9°C	68°C

A continuación, se ilustra en la Figura 5 la secuencia blanco de cada cebador utilizado en la Estrategia 2 específicamente. Cabe resaltar que el cebador RK utilizado en la Estrategia 1, también fue utilizado en la Estrategia 2 como cebador reverso, pero no se detalla a continuación.

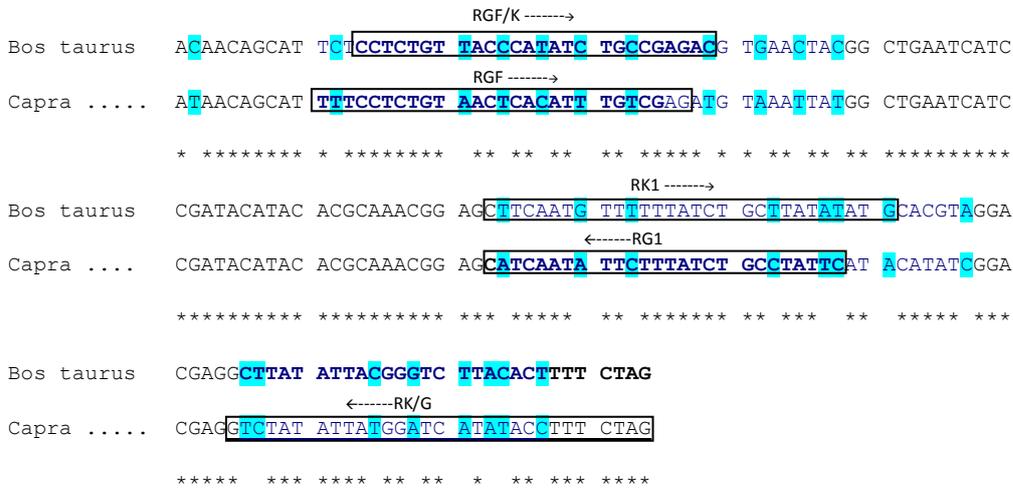


Figura 5. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados en la Estrategia 2 y su secuencia blanco. Los asteriscos y las cajas celestes indican los sitios idénticos y diferentes a la secuencia del cebador, respectivamente. Los marcos encuadran las secuencias de los cebadores directos RGF/K, RGF, RK1 y de los reversos RG1 y RK/G.

Se detalla a continuación el tamaño de los amplicones obtenidos según los pares de cebadores utilizados para ambas estrategias.

Tabla 4. Cebadores utilizados en ambas estrategias y tamaño del amplicón resultante para cada especie según el par de cebadores utilizado.

Cebador 1	Cebador 2	Tamaño del amplicón	Especie que se amplifica
Fsim	RK	274 pb	Vaca
Fsim	RG	157 pb	Cabra
Fsim	RS	331 pb	Oveja
RGF/K	RK	138 pb	Vaca
RK1	RK	70 pb	Vaca
RGF	RK/G	141 pb	Cabra
RGF	RG1	70 pb	Cabra

B. Detección de maíz genéticamente modificado

En primer lugar se procedió, mediante PCR, a constatar la presencia de maíz como especie vegetal para cumplir con los objetivos que se plantean utilizando la secuencia conservada correspondiente al grupo de proteínas de alta movilidad (*hmga*) (Hernández *et al.*, 2004) (ver *Figura 3*). Los cebadores utilizados para amplificar dicha secuencia fueron HMGA-F y HMGA-R (*Tabla 5*) que dan lugar a un producto de 79pb (JRC referent report - Europe, 2011).

Para identificar si el ADN de maíz encontrado en las muestras era genéticamente modificado se trabajó mediante PCR con el nivel de rastreo únicamente (ver *Figura 2*). Para esto se utilizó la detección del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor y el terminador de la nopalina sintasa (t-Nos). El primero es común a la mayoría de los eventos genéticamente modificados, y por lo tanto útil para realizar un rastreo primario. En este trabajo se utilizó el par de cebadores CAMVP-35S-F y CAMVP-35S-R (*Tabla 5*) para su amplificación, que da un fragmento de 82 pb (Lipp *et al.*, 1999). T-Nos también es un elemento común entre varios de los eventos vegetales genéticamente modificados (Bevan, 1983) y para su detección se utilizaron los cebadores T-NOS-F y T-NOS-R (*Tabla 5*), ambos validados por el JRC europeo (2011). El amplicón generado al realizar PCR utilizando el par T-NOS, en caso de encontrarse la presencia de la secuencia t-Nos en la muestra problema, es de 84 pb. La utilización del promotor 35S en conjunto con la detección de t-Nos es un abordaje ideal para el rastreo de OGM.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados para detección de una secuencia endógena de maíz y maíz transgénico.

NOMBRE	SECUENCIA	Tm	Amplicón
HMGA - F	5'- TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA - 3'	58,9 °C	79 pb
HMGA - R	5'- GCTACATAGGGAGCCTTGTTCCCT - 3'	62,1 °C	
CAMVP-35S - F	5'- GCCTCTGCCGACAGTGGT - 3'	61,86 °C	82 pb
CAMVP-35S - R	5'- AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC - 3'	60,07 °C	
T-NOS - F	5'- CATGTAATGCATGACGTTATTTATG - 3'	56,4 °C	84 pb
T-NOS - R	5'- TTGTTTTCTATCGCGTATTAATGT - 3'	54,8 °C	

Controles positivos y negativos

En cada reacción de PCR se utilizó un control positivo conteniendo ADN puro de maíz genéticamente modificado y los cebadores pertinentes en cada ocasión, según el amplicón buscado en cada caso. A los controles negativos incluidos, no se les adicionó ADN para poder detectar una posible contaminación de la PCR.

Procedimiento

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de 0,2 mL, cada uno con 25 µl totales conteniendo: 100 ng ADN genómico, 2,5 µL Buffer 10X, 1,5 µL MgCl₂ 50 mM, 1 µl de cada cebador 10 mM, 0,25 µl dNTPs 10 mM, 0,15 µl Taq ADN polimerasa Inmolase (Bioline) y agua csp. 25 µl. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador *Eppendorf Mastercycle personal* que se programó para realizar una desnaturalización inicial a 94° por 4 min, seguida de 33 ciclos: 94° por 30 seg, 62° por 30 seg y 72° por 30 seg. Por último un ciclo a 72° por 7 min.

4.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

La visualización de los productos de PCR se realizó en geles de poliacrilamida 12%: 7 mL acrilamida:bisacrilamida 12% en TBE 1X (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8.0), 7 µL TEMED, y 70 µL de Persulfato de amonio 10%, utilizando la técnica de tinción de plata para su revelado que permite detectar hasta la presencia de 1 ng de ADN (Sanguinetti *et al.*, 1994). Estos geles permiten la visualización de fragmentos entre 50 y 300 pb aproximadamente y poseen alto poder de resolución, por lo que resultan ideales para la técnica utilizada.

Para la determinación del tamaño de los amplicones se utilizó el marcador de peso molecular 50 bp plus DNA Ladder no stain (Bioron) en todos los casos. Como solución tampón de carga, tanto en los geles de agarosa como de acrilamida, se utilizó el amortiguador de carga 5x *Crystal 5x DNA Loading Buffer Blue* (Bioline).

5 RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.1 Extracción de ADN y cuantificación

Se detallan a continuación, en las *Tablas 6, 7, 8 y 9* (y ver además *Figura 6*), los resultados obtenidos para la concentración y pureza de las extracciones de ADN tanto de los controles como de las muestras problema, obtenidas por espectrofotometría.

Tabla 6. Datos de concentración y de pureza de los controles de cabra extraídos de sangre, obtenidos con *Nanodrop Thermo Scientific ACTGen 3700*.

Muestra	Método					
	Dneasy Blood & Tissue kit			Micrométodo de proteinasa K modificado		
	Abs260	Abs260/280	[ADN] (ng/ μ L)	Abs260	Abs 260/280	[ADN] (ng/ μ L)
Sangre de Cabra con Heparina (SG1)	0,28	1,59	14,3	1,52	1,67	76,3
Sangre de Cabra con EDTA (SG2)	0,23	1,67	11,6	0,40	1,67	22,1
Sangre de Cabra pura (SG3)	0,10	1,55	5,0	0,02	0,43	1,0

En la *Tabla 6* se comparan los dos métodos de extracción utilizados para obtener ADN a partir de sangre de cabra. Los valores de concentración de ADN obtenido en las extracciones con el método de *Dneasy Blood & Tissue kit* se encuentran entre 5 y 14 ng/ μ L, mientras que las concentraciones de ADN obtenidas por el método *Micrométodo de proteinasa K modificado*, fueron más dispares y estuvieron entre 1 y 76 ng/ μ L.

Los valores de pureza obtenidos en las extracciones por el primer método fueron similares para las 3 muestras y estuvieron entre 1,55 y 1,67; sin embargo los valores obtenidos para el segundo método mostraron diferencias significativas según la muestra. Para este último caso se puede observar que para dos de las muestras (Sangre de Cabra con Heparina y Sangre de Cabra con EDTA) se obtuvo una pureza de 1,67, mientras que para la tercera (Sangre de Cabra pura) el valor fue de 0,43.

Para dos de las tres muestras, la extracción con *Micrométodo de proteinasa K modificado* resultó mejor, ya que los valores de pureza y/o concentración del ADN obtenido fueron más

altos. Para la tercer muestra (Sangre de Cabra pura) ocurrió lo contrario, pero con la utilización de ambos métodos los valores obtenidos no fueron buenos, por lo que puede suponerse que esta muestra no contenía un elevado número de células somáticas (Rea *et al.*, 2001). Además, debe tenerse en cuenta que a esta muestra no se le agregó anticoagulante en seguida de su extracción como a las otras dos, lo que puede haber impedido una buena extracción por la formación de coágulos de sangre.

Ambos métodos resultaron efectivos a la hora de extraer ADN, ya que se pudo trabajar con estas muestras posteriormente. Sin embargo, ninguno de los dos arrojó resultados óptimos, ya que se busca que la relación Abs 260nm /Abs 280nm sea mayor a 1,8 para determinar que el ADN tiene un alto grado de pureza. Un menor grado de pureza indica una mayor presencia de contaminantes, como proteínas, que pueden interferir luego en la utilización del producto de extracción, como puede ser para la realización de una PCR. Por otro lado, si bien los valores de concentración de ADN obtenidos permitieron su utilización en posteriores análisis, no fueron muy elevados.

Tabla 7. Datos de concentración y de pureza de los controles de cabra extraídos de leche, obtenidos con *Nanodrop Thermo Scientific ACTGen 3700*.

Muestra	Método		
	Dalmasso <i>et al.</i> , 2011		
	Abs260	Abs260/280	[ADN] (ng/μL)
LG1a	0,52	1,69	26,1
LG1b	0,36	1,29	17,8
LG2a	0,86	1,38	42,9
LG2b	0,49	1,23	24,4

Los valores de concentración de ADN extraído de leche caprina oscilaron entre 17,8 y 42,9 ng/μL. Los valores de pureza obtenidos estuvieron entre 1,23 y 1,69. Estos resultados demuestran que mediante el método Dalmasso *et al.* (2010), se pueden obtener cantidades de ADN adecuadas para su posterior utilización, pero que su pureza no es óptima, por lo que aquellas muestras con nivel más bajo de pureza podrían presentar dificultades cuando se utilicen en técnicas posteriores. Asimismo, los valores de concentración de ADN resultaron adecuados pero no elevados, estos pueden ser mejorados mediante una optimización de la técnica.

Tabla 8. Datos de concentración y de pureza de los controles de oveja extraídos de riñón, obtenidos con *Nanodrop Thermo Scientific ACTGen 3700*.

	Método		
Muestra	Dneasy Blood & Tissue kit		
	Abs 260	Abs 260/280	[ADN] (ng/ μ L)
OV1	1,79	1,44	89,8
OV2	1,26	1,56	62,9

Las extracciones de ADN de oveja a partir de riñón con el método *Dneasy Blood & Tissue kit* resultaron con un buen valor de concentración, oscilando entre 62 y 90 ng/ μ L, sin embargo los valores de pureza no fueron óptimos (entre 1,44 y 1,56), aunque de todos modos se pudo trabajar posteriormente con estas extracciones sin interferencia en la PCR.

La técnica *Dneasy Blood & Tissue kit* fue además utilizada para la extracción de ADN a partir de sangre de cabra (*Tabla 6*). Al comparar su efectividad en la extracción de ADN a partir de ambas matrices, podemos señalar que se obtuvieron mayores cantidades de ADN a partir del riñón de oveja que de la sangre caprina, pero la pureza obtenida estuvo más alejada del óptimo en este caso, lo que puede deberse a la presencia de gran cantidad de proteínas en la matriz en cuestión. Por tanto, no puede establecerse *a priori* una relación de efectividad entre la técnica de extracción y la matriz.

Tabla 9. Datos de concentración y de pureza de ADN de las muestras de quesos, obtenidos con *Nanodrop Thermo Scientific ACTGen 3700*.

	Método		
Muestra	Dellaporta modificado		
	Abs 260nm	Abs 260/280	[ADN] (ng/ μ L)
LCH	1,50	1,92	77,5
LP	3,25	1,95	163
CA	4,10	2,0	209
UN	1,06	1,50	53,4
CB	2,16	2,33	244
QT	0,31	0,49	15,6
QTB	4,27	1,95	214

El “Método Dellaporta modificado” ha sido utilizado anteriormente en nuestro laboratorio, y una vez más demostró ser excelente para la extracción de ADN a partir de queso, ya que los valores de concentración obtenidos estuvieron en general entre 53 y 244 ng/ μ L y de pureza entre 1,50 y 2,33, lo que representa en ambos casos que la técnica fue efectiva. Sin embargo, para la muestra QT (ver *Tabla 1*) se obtuvo una concentración de 15,6 ng/ μ L. Siendo esta la única muestra para la cual los valores concentración fueron bajos, puede suponerse que por el proceso de elaboración del queso, su ADN resultó muy degradado o que era muy baja la cantidad de células somáticas de la leche utilizada para hacer el producto (Rea et al., 2001) y la extracción no pudo ser como se esperaba. Por otro lado, la pureza de la muestra QT fue de 0,49, lo que tampoco es óptimo (pureza > 1,8) y puede deberse a la presencia de gran cantidad de interferentes (como por ejemplo proteínas) en la extracción de ADN.

Lo obtenido de todas las extracciones de ADN hechas con las diferentes técnicas, tanto de los controles como de las muestras problema, pudo ser utilizado posteriormente para su amplificación por PCR. Sin embargo, en el caso de los controles, únicamente se utilizaron las extracciones que presentaron una mayor concentración de ADN y una mejor resolución a la hora de visualizar el producto de amplificación por PCR.

Mediante una corrida electroforética en gel de agarosa 1% se comprobó que había ADN en todas las extracciones realizadas, lo que nos permitió proseguir con la investigación. En la *Figura 6* se muestra la fotografía del gel expuesto al transiluminador UV, donde se muestran los ADNs obtenidos de las extracciones y que se utilizaron posteriormente en las reacciones de PCR.

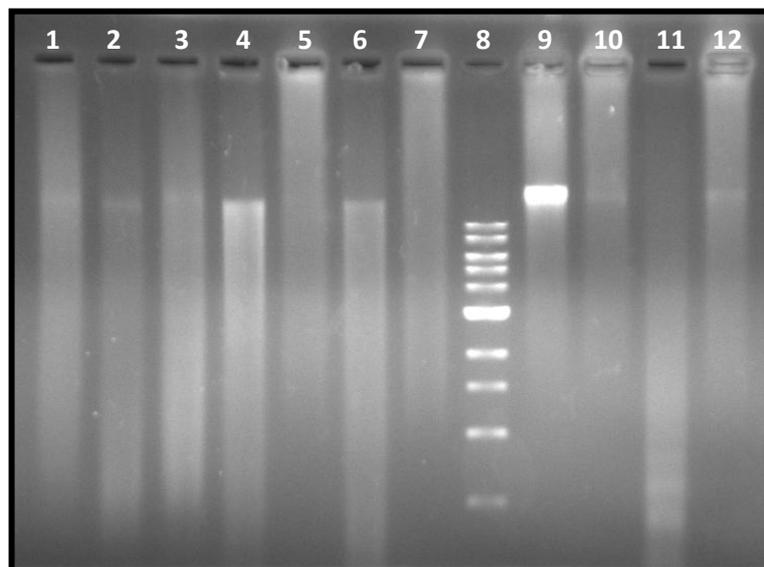


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa 1%. **1:** muestra LCH; **2:** muestra LP; **3:** muestra CA; **4:** muestra CB; **5:** muestra QT; **6:** muestra QTB; **7:** muestra UN; **8:** MPM 1kb DNA ladder (Biolabs) **9:** ADN control de cabra (SG1); **10:** ADN control de cabra (LG2a); **11:** ADN control de oveja (OV1); **12:** ADN control de vaca.

En la *Figura 6* se muestran los rendimientos e integridad de las extracciones de todas las muestras de queso (carriles del 1 al 7), los controles de cabra SG1 y LG2a (carriles 9 y 10) el control de oveja OV1 (carril 11) y el control de vaca (carril 12). Los controles seleccionados para mostrar en este gel fueron los posteriormente utilizados en las reacciones de PCR, menos LG2a que se muestra aquí para compararlo con SG1 y apoyar el uso de SG1 como control positivo de cabra.

En todos los carriles, menos en el 8, se sembraron aproximadamente 500 ng de ADN (teniendo en cuenta los valores obtenidos por espectrofotometría. El MPM en el carril 8 fue sembrado con aproximadamente 1000 ng. Esta diferencia se visualiza claramente debido a la intensidad que presenta el MPM en comparación con el resto de los carriles, a excepción del 9. La gran intensidad de la banda del carril 9 nos hace cuestionar los valores de concentración obtenidos para esta muestra por espectrofotometría. Queda claro que dicha intensidad corresponde a más de 500 ng, al comparar con la intensidad del MPM. Se decidió utilizar SG1 (carril 9) en vez de LG2a (carril 10) como control de cabra por la mayor concentración y menor degradación de ADN que presenta el primero.

El resto de los controles sembrados muestran presencia de ADN, con menor degradación (carriles 10 y 12) o con mayor nivel de degradación (carril 11). Es de notar, que como se nombró antes, el nivel de degradación del ADN puede estar en relación a la matriz de la que fue extraída, pero esto no necesariamente impide su utilización para la técnica de PCR.

Se comprobó que en todas las extracciones se obtuvo ADN, pero su calidad varió de una extracción a otra. En los carriles 1,2,3,4,6,9,10 y 12 puede visualizarse (con distinta intensidad) la presencia de una banda, lo que indica que al menos parte del ADN no se encuentra degradado (ya que se observa además un *smear*). Por otro lado, en los carriles 5, 7 y 11 solo se observa un *smear*. Es de recordar que las muestras fueron obtenidas en su mayoría (carriles del 1 al 7) de un alimento procesado como es el queso de cabra, por lo que es de esperar que exista degradación de ADN. Sin embargo, esta degradación evidenciada por la visualización de un *smear* no implica que no se pueda proseguir con los estudios (ver 5.2).

Al intentar correlacionar la intensidad visualizada en la *Figura 6* con los valores obtenidos para cada extracción mediante espectrofotometría, observamos distintos comportamientos. La muestra con mayor concentración (CB) (*Tabla 9*) es la que presenta una mayor intensidad de

banda (carril 4 de la *Figura 6*), e incluso probablemente su concentración sea mayor que la indicada en la cuantificación directa porque se destaca esta banda frente a las otras (*Figura 6*). La muestra que presenta una menor concentración (QT) fue sembrada en el carril 5 y no se observa allí una banda definida sino que simplemente un *smear*, donde se debe destacar que presenta un alto grado de impurezas (el *smear* se detecta desde el comienzo de la corrida). Esto último puede ser la causa de los bajos valores de pureza de la muestra (*Tabla 9*). En el resto de los carriles la intensidad fue similar entre sí, lo que indica que los valores obtenidos por espectrofotometría fueron adecuados al ser tomados en cuenta para sembrar la misma cantidad de ADN en todos los carriles.

Todas las extracciones de ADN aquí mostradas, independientemente de su nivel de degradación, pudieron ser utilizadas posteriormente en reacciones de PCR (ver 5.2)

5.2 Amplificación por PCR

5.2.1 Puesta a punto de la técnica.

Luego de extensas pruebas, se logró poner a punto el programa de ciclado a utilizar para cada par de cebadores. Para establecer el rango de prueba de T_m para cada uno, se tuvo en cuenta la sugerida por el proveedor de los cebadores, la hallada según Wallace *et al.* (1979) (*Tablas 2, 3 y 5*) y lo descrito por Matsunaga *et al.* (1999) cuando correspondió. El rango de T_m utilizado para probar la mejor amplificación de los cebadores fue entre 60°C y 70°C.

El programa finalmente utilizado para cada par de cebadores se encuentra detallado en el apartado “Metodología” (ver 4.6.1).

5.2.2 Detección de ADN de cabra y de vaca.

ESTRATEGIA 1. Según lo descrito por Miller (Lic. Agustín Miller, tesis de grado, 2010), el método descrito por Matsunaga *et al.* (1999) permite detectar hasta un mínimo de 4,5 ng de ADN de vaca en un fondo de 90 ng de ADN de cabra. Esto implica que cualquier detección que se haga de ADN de vaca en las muestras de queso representa probablemente más del 5% del total del ADN presente. Esto no puede tomarse como dato certero, hasta tanto no se realice la

cuantificación del mismo, pero pueden hacerse inferencias sobre la posible cantidad de ADN de vaca presente en cada muestra.

Se realizó la comprobación de la presencia de ADN de cabra en las muestras utilizando los cebadores Fsim y RG (*Tabla 2*). Ver *Figura 7*.

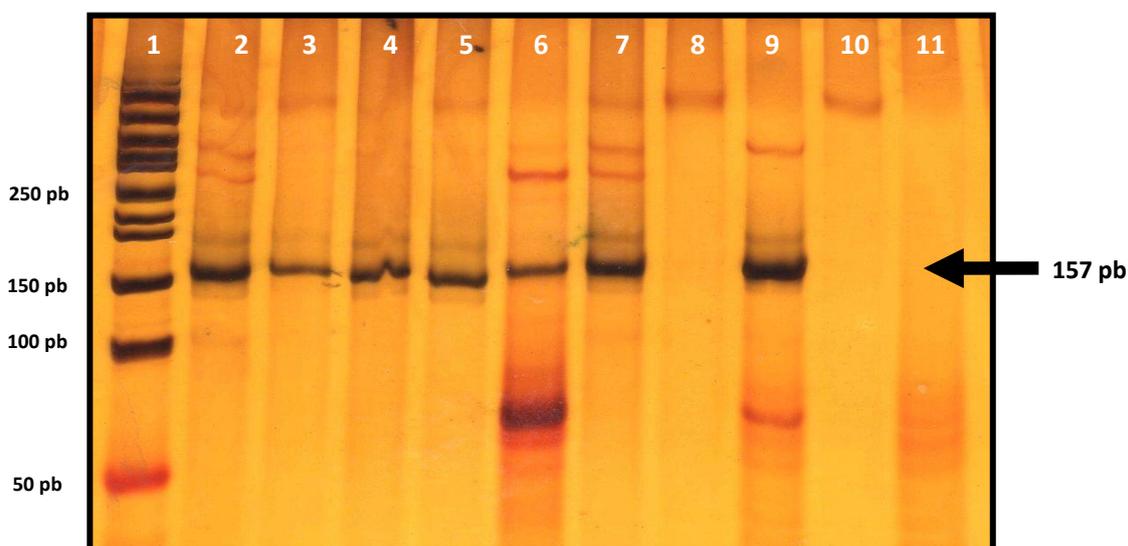


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR con cebadores Fsim y RG. Ampliación esperada: 157pb. **1:** MPM 50pb (Bioron); **2:** muestra LCH; **3:** muestra LP; **4:** muestra CA; **5:** muestra CB; **6:** muestra QT; **7:** muestra QTB; **8:** muestra UN; **9:** ADN control de cabra (SG1); **10:** ADN control de vaca; **11:** Control negativo de PCR.

En la *Figura 7* se muestra el producto de amplificación por PCR para todas las muestras. Una banda de 157 pb fue detectada en los carriles del 2 al 7, correspondientes a las muestras LCH, LP, CA, CB, QT y QTB respectivamente y en el carril 9 que corresponde al control positivo. No se observa la presencia de dicha banda en los carriles 8, 10 y 11. Esto implica que la muestra UN no presenta ADN de cabra, y que tanto el control negativo como la prueba de reacción cruzada con ADN de vaca dieron como se esperaba.

Se pudo así comprobar que todos los quesos que declaran tener “leche de cabra” en su etiqueta, efectivamente presentan ADN de este animal. Cabe recordar que la muestra de queso UN indica en su etiqueta la presencia únicamente de leche bovina.

Posteriormente, se realizó la amplificación de fragmentos de ADN por PCR con los cebadores Fsim y RK (*Tabla 2*) y su resultado se muestra a continuación en la *Figura 8*.

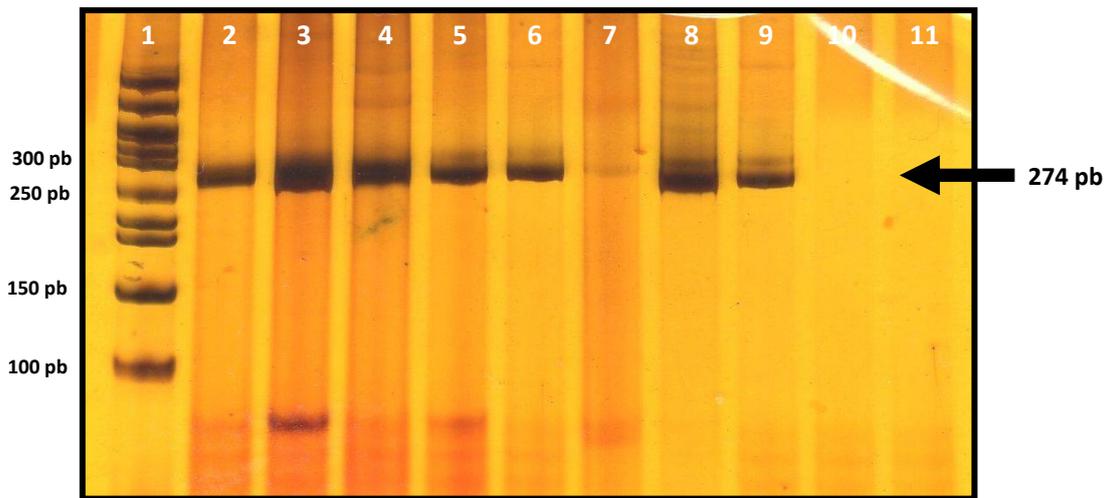


Figura 8. Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR con cebadores Fsim y RK. Amplicón esperado: 274pb. 1: MPM 100pb (Bioron); 2: muestra LCH; 3: muestra LP; 4: muestra CA; 5: muestra CB; 6: muestra QT; 7: muestra QTb; 8: muestra UN; 9: ADN control de vaca; 10: ADN control de cabra (SG1); 11: Control negativo de PCR.

En la *Figura 8* se observa una banda de 274 pb en los carriles correspondientes a la mayoría de las muestras de queso (LCH, LP, CA, CB, QT, UN) evidenciando la presencia de ADN de vaca en ellas. La intensidad de las bandas fue similar en los carriles del 2 al 6, en el 8 y en el control positivo. En el carril 7 se observa una sombra a 274 pb, pero al comparar su intensidad con el control positivo (carril 9) este resultado es clasificado como negativo.

Los controles positivo (carril 9) y negativo (carril 11) dieron como se esperaba, y no se halló reacción cruzada de los cebadores utilizados con ADN de cabra (carril 10). Esto valida los resultados encontrados para todas las muestras de queso.

De todos los quesos utilizados en este trabajo, solo UN y QT declaran en su etiqueta contener leche de vaca, pero sin embargo el resultado arrojado por la Estrategia 1 indica que también los quesos LCH, LP, CA y CB presentan ADN bovino. Esto puede deberse a una adulteración del producto o simplemente a una contaminación. Para su comprobación es necesario cuantificar.

ESTRATEGIA 2. La estrategia propuesta consistió, en una primera instancia, en el uso de 4 pares de cebadores (2 para la amplificación de ADN de cabra y 2 para la amplificación de ADN

de vaca). De los 4 pares de cebadores que fueron utilizados al comienzo (RGF/K – RK ; RK1 – RK; RGF-RK/G; RGF – RG1), si bien se comprobó que amplificaban de manera correcta, únicamente se utilizaron 2 de ellos para continuar con el análisis, ya que fueron los que reaccionaron de manera más específica y por tanto dieron el resultado más claro: RGF/K – RK (amplifica ADN de vaca) y RGF – RG1 (amplifica ADN de cabra).

Se expone en la *Figura 9* la amplificación de ADN de cabra con los cebadores RGF y RG1.

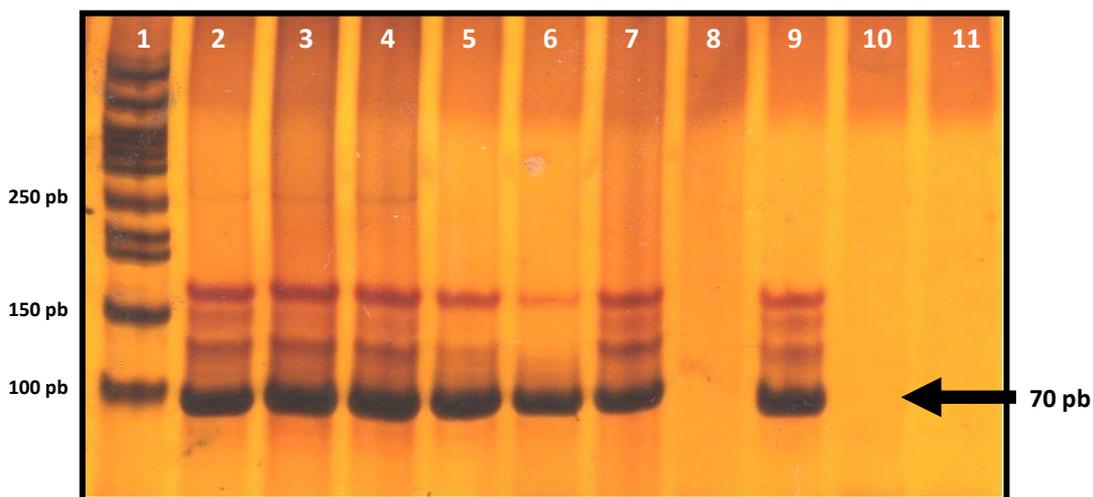


Figura 9: Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR con cebadores RGF y RG1. Amplicón esperado: 70 pb. **1:** MPM ladder 50pb (Bioron); **2:** muestra LCH; **3:** muestra LP; **4:** muestra CA; **5:** muestra CB; **6:** muestra QT; **7:** muestra QTB; **8:** muestra UN; **9:** ADN control de cabra; **10:** ADN control de vaca; **11:** control negativo de PCR.

En los carriles del 2 al 7 y el 9 (control positivo) de la *Figura 9* se puede visualizar una banda de 70 pb correspondiente a la presencia de ADN de cabra. Se comprueba entonces que las muestras LCH, LP, CA, CB, QT y QTB (correspondientes a los carriles del 2 al 7) fueron elaboradas con leche de cabra como indican en su etiqueta. No se observa dicha banda en el carril 10 (ADN de vaca) ni en el 11 (control negativo), por lo que los resultados obtenidos pueden tomarse como válidos, al no detectarse reacción cruzada ni un mal manejo al elaborar la PCR. La ausencia de una banda de 70 pb en el carril 8, afirma que dicho queso no contiene leche de cabra.

Cabe tener en cuenta que si bien se visualiza claramente una banda de 70 pb como el principal producto de amplificación, existen amplicones de mayor peso molecular arrojados por estos

cebadores (ver *Figura 9*), lo que lo implica que no son totalmente específicos para la secuencia blanco.

Se observa en la *Figura 10* un PAGE correspondiente a los productos de amplificación por PCR de las muestras de queso y los controles con cebadores reversos de Matsunaga *et al.* (1999) (RGF/K y RK).

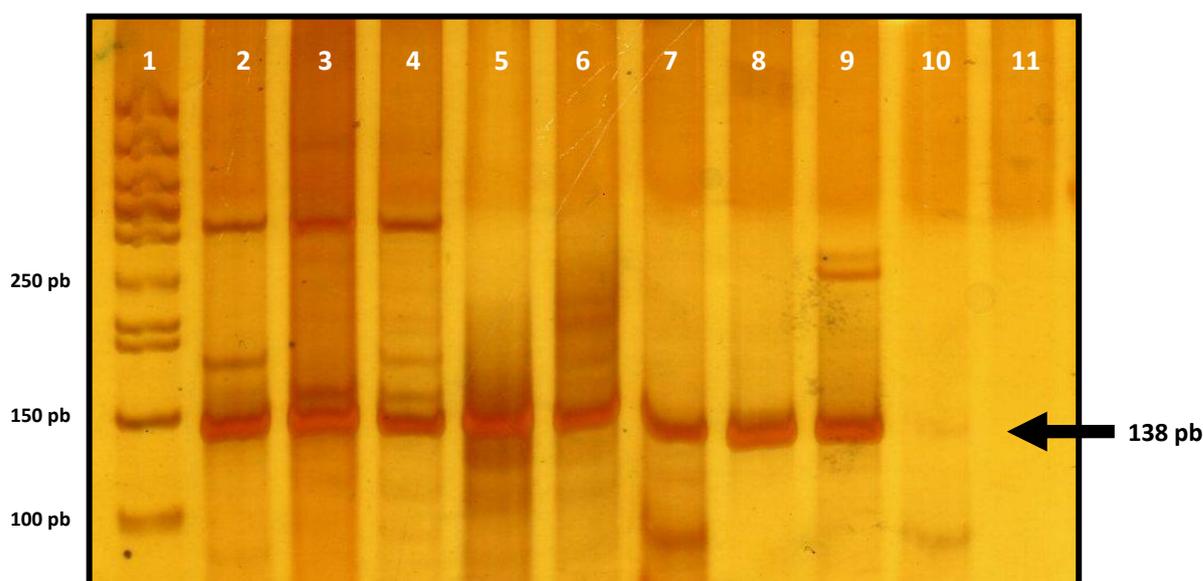


Figura 10: Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR con cebadores RGF/K y RK. Amplificación esperada: 138 pb. **1:** MPM ladder 50pb (Bioron); **2:** muestra LCH; **3:** muestra LP; **4:** muestra CA; **5:** muestra CB; **6:** muestra QT; **7:** muestra QTb; **8:** muestra UN; **9:** ADN control de vaca; **10:** ADN control de cabra (SG1); **11:** control negativo de PCR.

En todas las muestras de queso se encontró presencia de ADN bovino, al visualizarse una banda de 138 pb en los carriles del 2 al 8 de la *Figura 10*. El resultado del control positivo, en conjunto con la ausencia de amplificación en el carril 11 (control negativo), validan los resultados.

El trabajo con estos cebadores no ha sido sistemático y los resultados obtenidos no siempre fueron consistentes. La *Figura 10* fue expuesta a modo de ilustrar algunos de los resultados, pero no resulta para nosotros una conclusión fiable. Se han probado los cebadores con distintos ciclos de amplificación, pero no mejora la especificidad de los resultados. A modo de ejemplo, la muestra UN ha dado positiva y negativa indistintamente en los diferentes ensayos realizados. Además hemos visualizado que en algunas ocasiones la prueba de reacción cruzada no es totalmente negativa (se observa una sombra de 138 pb en el carril 10 de la *Figura 10*). Si

bien este último punto no resulta significativo, es necesario tener en cuenta este *background* a la hora de anunciar los resultados.

Por otra parte, el carril 7 de la *Figura 10* muestra la presencia de ADN bovino en la muestra QTB, lo que no es consistente con el ensayo realizado con los cebadores Fsim y RK (que amplifican para vaca según Mastunaga *et al.* (1999)), lo que en conjunto con lo dicho en el párrafo anterior, no nos permite validar el par de cebadores RGF/K y RK para detectar la presencia de ADN de vaca en una muestra de queso con los resultados de los ensayos realizados en este trabajo.

De acuerdo a lo observado en las *Figuras 7, 8, 9 y 10* se concluye lo que muestra a continuación la *Tabla 10*.

Tabla 10. Comparación entre lo declarado en las etiquetas de las muestras problema y las especies encontradas en este trabajo mediante las dos estrategias utilizadas.

Muestra	Especies declaradas	Especies encontradas con la Estrategia 1	Especies encontradas con la Estrategia 2
LCH	Cabra	Vaca / Cabra	Vaca / Cabra
LP	Cabra	Vaca / Cabra	Vaca / Cabra
CA	Cabra	Vaca / Cabra	Vaca / Cabra
CB	Cabra	Vaca / Cabra	Vaca / Cabra
QT	Cabra, Vaca y Oveja	Vaca / Cabra	Vaca / Cabra
QTB	Cabra	Cabra	Vaca / Cabra
UN	Vaca	Vaca	Vaca

Mediante la utilización de ambas estrategias se pudo probar que en todas las muestras de queso, menos en QTB, hay presencia de ADN de vaca. En aquellos quesos que no declaran en su etiqueta contener leche de vaca (LCH, LP, CA, CB), su presencia puede deberse a una simple contaminación o a una adulteración del producto. Según indica el Reglamento Bromatológico Nacional (febrero de 2012) un alimento adulterado “es el alimento que ha sido privado parcial o totalmente de los componentes característicos del genuino, sustituyéndolos o no por otros inertes o extraños, o que ha sido tratado con agentes diversos para disimular alteraciones o defectos de elaboración. También se considera alimento adulterado el que ha sido adicionado de agua u otro producto de relleno.”

Para comprobar si la presencia de ADN de vaca se debe a una contaminación o a un caso de fraudulencia, debe detectarse la cantidad de ese ADN presente en las muestras, lo que puede llevarse a cabo mediante la utilización de PCR en Tiempo Real.

Para la muestra QTB no se obtuvieron resultados congruentes. Cuando se utilizó la Estrategia 1 no se detectó la presencia de ADN bovino, mientras que lo contrario ocurrió con la Estrategia 2. Tomamos como válidos los resultados de la Estrategia 1, ya que esta fue provista por la literatura y ha sido probada en varias oportunidades en nuestro laboratorio; mientras que la Estrategia 2 no está validada aun para este tipo de estudios.

¿Reacción cruzada?

Los resultados que arrojó el estudio de reacción cruzada, indican que mientras el cebador reverso propuesto por Matsunaga *et al.*, 1999 para amplificar ADN de oveja (RS) es complementario en su totalidad con el ADN problema (exactamente con 26 nucleótidos), el cebador reverso propuesto para amplificar ADN de cabra (RG) coincide en 22 nucleótidos con el ADN problema (ver *Figura 11*).

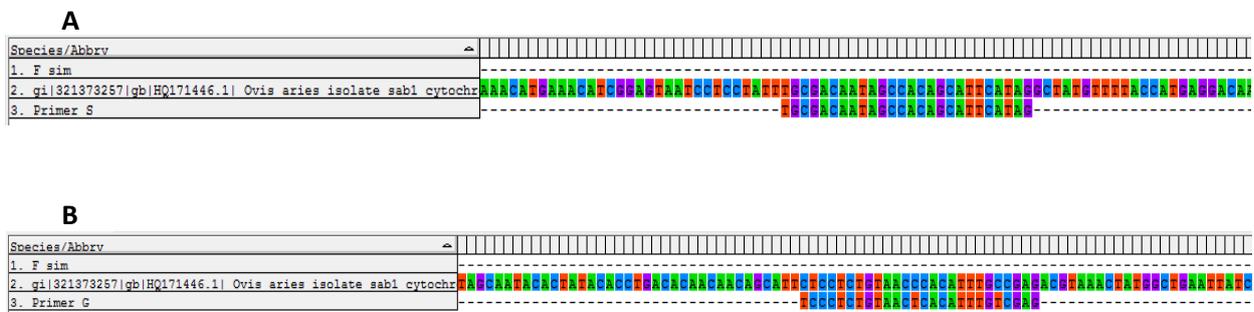


Figura 11. Alineamientos de la secuencia de ADN de oveja con A) cebador RS y B) cebador RG.

Luego del estudio bioinformático se realizó el análisis por PCR en las condiciones descriptas en el apartado 4.6.1 para la Estrategia 1, con los cebadores Fsim y RG sobre ADN de oveja extraído como se detalla en el apartado 4.2. Para el control positivo se utilizó ADN puro de cabra extraído en nuestro laboratorio (ver 4.2) con los cebadores aquí indicados. No se muestra aquí la electroforesis en gel de poliacrilamida 12% porque los resultados no fueron significativos para nuestro estudio. Como resultado, el control positivo amplificó como se esperaba y en el control negativo no se obtuvo amplificación. La amplificación de la secuencia blanco (ADN de oveja) no arrojó el producto esperado, y por tanto se concluye que a pesar del alto grado de analogía entre el cebador reverso RG y la secuencia de ADN de oveja, el par Fsim

- RG no amplifica ADN de oveja. Esto indica que la amplificación de las muestras con dicho par de cebadores no implica en ningún caso que haya sido producto de reacción cruzada.

Esto permite descartar la posibilidad de que los resultados positivos arrojados por los cebadores Fsim –RG se deban a la amplificación de ADN ovino.

Detección de maíz genéticamente modificado

A. El primer paso para detectar maíz genéticamente modificado en las muestras problema, fue utilizar el par de cebadores HMGA-F y HMGA-R para amplificación de un gen endógeno de maíz (*hmga*). El resultado de la amplificación por PCR con estos cebadores se muestra en la *Figura 12*.

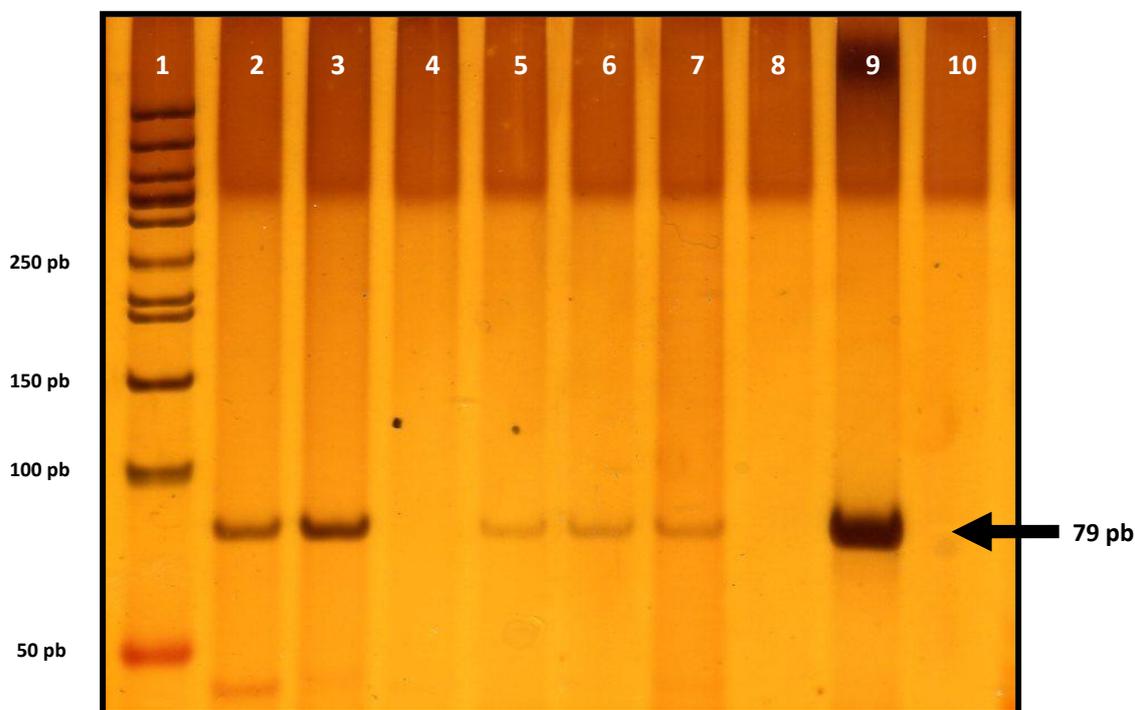


Figura 12. Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR con cebadores HMGA-F y HMGA-R. Amplicón esperado: 79 pb. **1:** MPM ladder 50pb (Bioron); **2:** muestra LCH; **3:** muestra LP; **4:** muestra CA; **5:** muestra CB; **6:** muestra QT; **7:** muestra QTB; **8:** muestra UN; **9:** ADN control de maíz; **10:** control negativo de PCR.

Como se observa en la *Figura 12*, no todas las muestras de queso presentan maíz en su composición. En las muestras LCH, LP, CB, QT y QTB (carriles 2,3,5,6 y 7) se encontró el fragmento correspondiente al gen *hmga* que amplifican los cebadores HMGA-F y HMGA-R (banda de 79 pb), lo que corresponde con la banda que se visualiza en el carril 9 (control positivo). Los carriles 4 y 8 (muestras CA y UN) no presentaron producto de amplificación. El

carril 10 correspondiente al control negativo no arrojó ninguna banda, lo que en conjunto con el resultado del control positivo en el carril 9, valida los resultados obtenidos.

Se debe tener en cuenta que la menor intensidad de las bandas en los carriles 2,3,5,6 y 7 con respecto a la intensidad de la banda del carril 9, radica en la matriz utilizada, ya que el control positivo sembrado en el carril 9 presenta un 100% de maíz, por lo que el número de amplicones obtenido siempre será mayor al esperado en las muestras de queso, cuyo porcentaje de maíz es significativamente menor.

B. Luego, se procedió a utilizar el par de cebadores para amplificación de la secuencia 35S que indica la presencia de maíz genéticamente modificado y se obtuvo lo observado en la *Figura 13*.

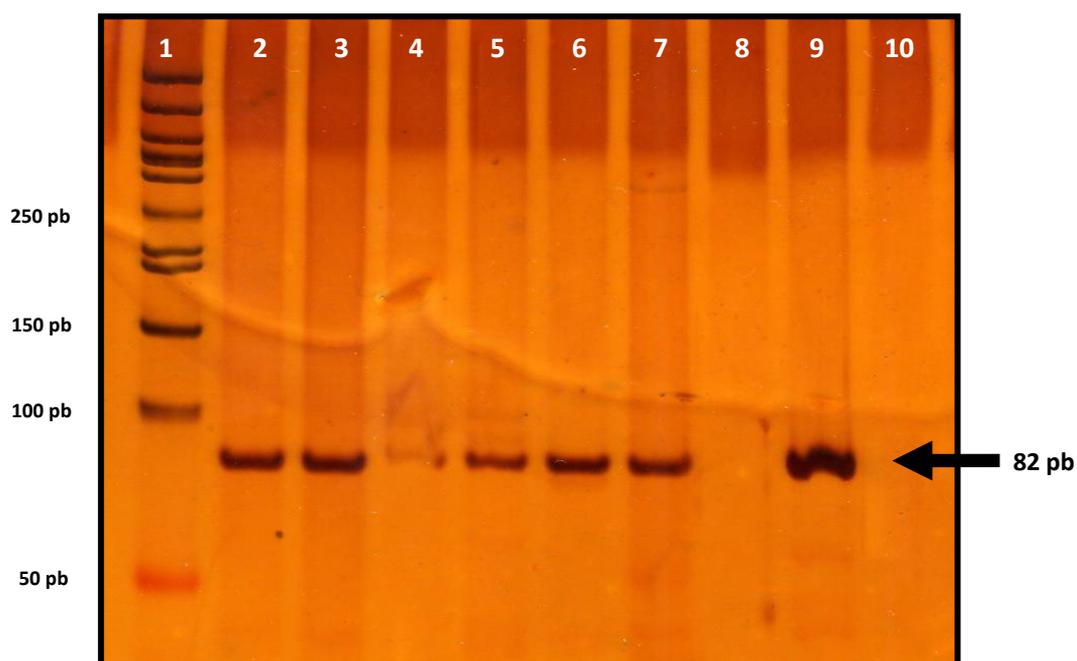


Figura 13: Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR con cebadores CAMVP-35S – F y CAMVP-35S - R. Amplicón esperado: 82 pb. **1:** MPM ladder 50pb (Bioron); **2:** muestra LCH; **3:** muestra LP; **4:** muestra CA; **5:** muestra CB; **6:** muestra QT; **7:** muestra QTB; **8:** muestra UN; **9:** ADN control de maíz conteniendo la secuencia 35S; **10:** control negativo de PCR.

Se puede distinguir en la *Figura 13* que en 5 de las 7 muestras (carriles 2,3,5,6 y 7) se obtuvo un producto de amplificación de 82pb correspondiente a la secuencia del promotor 35S, lo que indica la presencia de un gen foráneo en el maíz de las muestras LCH, LP, CB, QT y QTB. Por otro lado, no se visualiza la banda en cuestión en el carril 4 (muestra CA) ni en el 8 (muestra

UN). El control positivo sembrado en el carril 9 y el control negativo sembrado en el carril 10 arrojaron los resultados esperados, validando la amplificación con los cebadores en cuestión.

Este resultado es coherente con el arrojado por la amplificación del gen *hmgA* (Figura 12), ya que en las muestras en las que no se encontró presencia de maíz, tampoco hubo amplificación del promotor 35S.

C. Se procedió a la amplificación por PCR con cebadores para el terminador t-Nos a fin de comprobar la transgenicidad del almidón de maíz encontrado en las muestras problema. Este terminador se encuentra en los eventos Bt11, NK603 y GA21 de maíz transgénico (JRC referent report - Europe, 2011), de tal manera que si t-Nos es detectado implica la presencia de alguna de estos eventos en el maíz utilizado en cada muestra. En la Figura 14 se muestran los resultados de esta amplificación.

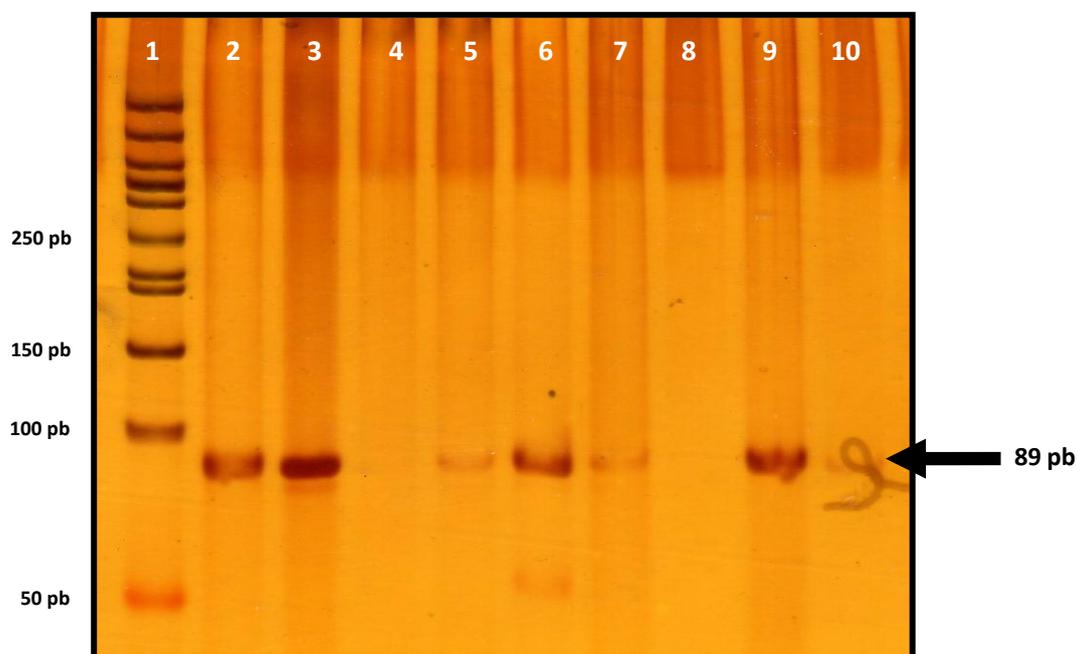


Figura 14: Gel de poliacrilamida 12%. Productos de amplificación por PCR con cebadores T-NOS-F y T-NOS-R. Amplificación esperada: 89 pb. **1:** MPM ladder 50pb (Bioron); **2:** muestra LCH; **3:** muestra LP; **4:** muestra CA; **5:** muestra CB; **6:** muestra QT; **7:** muestra QTB; **8:** muestra UN; **9:** ADN control de maíz conteniendo la secuencia t-Nos; **10:** control negativo de PCR.

En los carriles 2, 3, 6 y 9 de la Figura 14 se observa una banda de 89 pb correspondiente al producto de amplificación por PCR de la secuencia t-Nos. Esto indica que las muestras de los quesos LCH, LP y QT contienen maíz genéticamente modificado, y que el control positivo amplificó correctamente. Los carriles 5 y 7, correspondientes a las muestras CB y QTB, respectivamente, muestran una banda muy tenue de 89 pb, que es de la misma intensidad que

la banda del carril 10 (control negativo), por lo que no puede darse un resultado certero sobre la presencia de la secuencia t-Nos en las muestras CB y QTB. Se sugiere realizar esta amplificación nuevamente, ya que la presencia de una pequeña banda en el carril correspondiente al control negativo pone en duda los resultados.

Por otro lado, en los carriles 4 y 8 que corresponden a las muestras CA y UN, respectivamente, no se visualiza producto de amplificación. Esto concuerda con los resultados obtenidos para estas muestras en las amplificaciones con los cebadores HMGA-F y HMGA-R (*Figura 12*) y 35S-F y 35S-R (*Figura 13*), que fueron todas negativas.

En la *Tabla 11* se resumen los resultados de las *Figuras 12, 13 y 14* correspondientes a la amplificación de las secuencias de *hmgA*, 35S y t-Nos, respectivamente.

Tabla 11. Resultados encontrados en todas las muestras correspondientes a la detección de maíz y secuencias indicadoras de eventos transgénicos de maíz. Referencias: + : positivo; - : negativo, +/- : dudoso.

Muestra	Presencia de maíz	Detección de 35 S	Detección de t-Nos
LCH	+	+	+
LP	+	+	+
CA	-	-	-
CB	+	+	+/-
QT	+	+	+
QTB	+	+	+/-
UN	-	-	-

Los quesos LCH, LP, CB, QT y QTB muestran claramente que contienen maíz transgénico, luego de ser detectado el gen *hmgA* y las secuencias pertenecientes al promotor 35S en ellos. Además, el terminador t-Nos fue encontrado en el ADN correspondiente a las muestras LCH, LP y QT, lo que indica que el evento transgénico presente en el maíz de estos quesos puede ser Bt11, GA21 o NK603, o alguno de los eventos apilados de los cuales estos forman parte (ver *Figura 1*).

6 CONCLUSIONES

6.1 Extracción de ADN

Se encontró una correlación entre los resultados de concentración y pureza obtenidos mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa para todas las extracciones de ADN de muestras y controles, excepto para SG1, donde la medida obtenida con el *Nanodrop* fue sub estimada. Se sugiere en este caso volver a realizar la medida o utilizar otros equipos similares para evaluar esta extracción.

Los métodos utilizados para extracción de ADN a partir de sangre ovina permitieron una extracción con características de pureza y concentración suficientes para la posterior utilización de la muestra. Es de notar que los valores de concentración de ADN obtenidos a partir de la extracción con el *Micrométodo de proteinasa K modificado* fueron superiores que los obtenidos para *Dneasy Blood & Tissue kit* en 2 de las 3 extracciones. Sin embargo, se sugiere la optimización de ambos métodos para obtener mayores cantidades de ADN y con un mayor índice de pureza en posteriores estudios.

Las extracciones de ADN a partir de leche caprina (con el método Dalmasso *et al.*, 2011) y de riñón de oveja (con *Dneasy Blood & Tissue kit*) arrojaron ADN en concentraciones suficientes para su uso posterior y valores de pureza que no fueron óptimos pero no influyeron luego en la PCR.

Para 6 de las 7 muestras de queso de cabra problema, cuyo ADN se extrajo según el “Método Dellaporta modificado” los valores de concentración y de pureza fueron buenos, lo que permitió seguir trabajando con estas extracciones. La muestra QT probablemente presentaba un bajo número de células somáticas o por el proceso de elaboración del queso su ADN se encontraba muy degradado, ya que los valores de concentración y pureza luego de su extracción resultaron muy bajos comparados con el resto de las muestras problema, para las que se utilizó el mismo método. Podemos afirmar entonces, que el método de Dellaporta *et al.* (1983) modificado en nuestro laboratorio es bueno para la extracción de ADN a partir de queso. En nuestro laboratorio este mismo método se ha utilizado para la extracción de ADN a partir de otras matrices como hamburguesas de soja, hamburguesas de carne, polenta y panchos, y los resultados han sido similares, lo que muestra que el método tiene un amplio espectro de acción en cuanto a matrices alimentarias se trata.

6.2 Amplificación por PCR

Las estrategias utilizadas para amplificación de secuencias de especies animales por PCR resultaron con distinta especificidad, pero con ambas se obtuvieron los productos deseados. Tanto con los cebadores de Matsunaga *et al.* (1999), como con los que fueron diseñados en nuestro laboratorio, se logró la amplificación adecuada de secuencias de ADN de vaca y de cabra, pudiendo visualizar correctamente las bandas correspondientes sin interferencia. Sin embargo, la especificidad del método Matsunaga *et al.* (1999) resultó mayor a la Estrategia 2, debido a que en la amplificación de ADN bovino el primero amplificó para 6 de las 7 muestras y el segundo arrojó resultados 100% positivos. Además, se observó que los cebadores utilizados en la Estrategia 2 para amplificar ADN bovino, también amplifican levemente ADN de cabra. Esto implica que los resultados obtenidos por esta estrategia no son del todo exactos. Por otro lado, los cebadores para amplificación de ADN caprino arrojaron amplicones de variado peso molecular además del esperado, lo que los hace poco específicos. Es de destacar que se realizaron pruebas con un amplio rango de Tms hasta lograr la ausencia de amplificación del producto deseado, pero los resultados no mejoraron en ninguno de los casos.

En el presente trabajo se utilizó la Estrategia 1 (Matsunaga *et al.*, 1999) como control para verificar la posible utilización de la Estrategia 2 para el cumplimiento de los mismos objetivos, por ser una metodología que está en la literatura y que ha sido probada en nuestro laboratorio. El hecho de encontrar incongruencias entre los resultados arrojados por ambas estrategias nos hace cuestionar sobre el posible uso de la Estrategia 2 para los objetivos planteados. Esta técnica mostró resultados que no fueron del todo reproducibles, lo que nos hace dudar sobre su robustez y especificidad. Asimismo, cabe resaltar que durante todo el estudio resultó más difícil obtener resultados “limpios” con la Estrategia 2, ya que frecuentemente se encontraban amplicones de variado tamaño (además del amplicón buscado). Se sugiere que para continuar con los estudios de la Estrategia 2, se prueben distintos ciclados para aumentar su especificidad o se utilice la técnica de PCR en Tiempo Real, que permite cuantificar el amplicón arrojado por los cebadores utilizados frente a una secuencia blanco. Cabe destacar que en el presente estudio se realizaron pruebas a distintas Tm con el objetivo de aumentar la especificidad de estos cebadores, pero no se obtuvieron mejoras.

Tomando como válidos los resultados obtenidos por la Estrategia 1 (método Matsunaga *et al.* (1999)), se comprobó la presencia de leche caprina en todos los quesos (menos en aquél que

era puro de vaca) y se descubrió que 6 de las 7 muestras estudiadas contenían leche bovina, y no todas ellas lo declaraban en su etiqueta.

Para dilucidar si la presencia de ADN bovino se debe a una adulteración del producto manufacturado o simplemente a una contaminación de la partida, se debe proceder a la cuantificación del mismo, ya que la técnica de PCR utilizada en este trabajo es una herramienta analítica cualitativa. En este caso, también se sugiere la técnica de PCR en Tiempo Real para abordar el problema, ya que esta constituye un método más exacto y sensible para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos que la técnica de PCR en punto final.

Los resultados obtenidos en la detección de especies animales muestran la importancia de este tipo de estudios, donde se obtiene información que no está declarada de forma explícita en las etiquetas de los alimentos.

Por otro lado, la amplificación de secuencias del gen endógeno de maíz *hmgA* en algunas de las muestras de queso, indica con claridad la utilización de almidón de maíz en ellas. El Codex Alimentarius establece que se le puede adicionar almidón de maíz a la fabricación de quesos “siempre y cuando se agreguen solamente en cantidades funcionalmente necesarias de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación, y tomando en cuenta todo uso de estabilizantes/espesantes listados”. Por esto, no resulta raro haber detectado la presencia de maíz en 5 de los 7 quesos analizados. En todas las muestras que contienen maíz utilizado para estabilizar o espesar los quesos se encontró que es de origen transgénico. No es de extrañar que esto suceda en las muestras de queso uruguayo, ya que casi todo el maíz que aquí se comercializa es genéticamente modificado. Queda aún por saber qué cantidad es realmente transgénico, pero sí de seguro existen al menos trazas detectables mediante PCR.

BIBLIOGRAFÍA

Bevan, M. (1983). *Nucleic Acid Research*, v. 11, p. 369-385.

Botti, S. & Giuffra, E. (2010). Oligonucleotide indexing of DNA barcode: identification of tuna and other scombrid species in food product. *BMC Biotechnology*, v. 10, p. 60-67.

Boyazoglu, J. & Morand-Fehr, P. (2001). Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality. A critical review. *Small Ruminant Research*, v. 40, n. 1, p. 1-11.

Commission Regulation (2001). Reference method for detection of cow's milk and caseinate in cheeses from ewe's, goat's and buffalo's milk. EC regulation No 213/2001 of 9 January 2001, *Official Journal of European Union.*, L37, p. 51-60.

Compendium of reference methods for GMO analysis (2011). JRC referent report, European Union Reference laboratory for GM food and feed.

Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio) (2013). *La Biotecnología*. <<http://www.argenbio.org>>. [Consulta: 10 de octubre de 2013].

Cordella, C., Moussa, I., Martel, A., Sbirrazzuoli, N. & Lizzani-Cuvelier, L. (2002). Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 50, p. 1751-1764.

Chacon, Alejandro (2013). Profesor de la Universidad de Costa Rica - Sede "Rodrigo Facio Brenes" Montes de Oca, San José Costa Rica, Código Postal 2060 San José.

Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P., Van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgensen, T., Cameron, K. M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T. A. J., Conrad, F., Salazar, G. A., Richardson, J., Hollingsworth, M. L., Barraclough, T. G., Kelly, L. & Wilkinson, M (2007). A Proposal for a Standardised Protocol to Barcode All Land Plants. *Taxon*, v. 56, n. 2, p. 295-299.

Chile Bio (2013) [en línea]. Manual de consulta sobre cultivos transgénicos. Disponible en: <<http://chilebio.cl>>.

Dalmaso, A., Civera, T., La Neve, F. & Bottero, M. T. (2011) . Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay. *Food Chemistry*, n. 124, p. 362–366.

Dellaporta, S.L., Wood, J., James, B. & Hicks, J.B. (1983). A Plant DNA Minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 1, n. 4, p. 19-21.

Diario Oficial Uruguay (2008). Decreto 353/008. Dícense normas relativas a Bioseguridad de vegetales y sus partes genéticamente modificadas y deróganse los Decretos 249/000 y 37/007. Nº 27.534 p. 219-A.

Diario Oficial de la Unión Europea (2003). Trazabilidad y etiquetado de los Organismos Genéticamente Modificados. Reglamento (CE) nº1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo.

Estonba, A. & Manzano, C., (2009). Aplicación de la tecnología del ADN en la seguridad y calidad agroalimentaria. *Encuentros Sectoriales Universidad-Empresa*. Vicerrectorado de Investigación UPV/EHU (Ed.) p. 53-76.

FAO & WHO (2002). Principios para la Rastreabilidad/Rastreo de Productos como herramienta en el contexto de la inspección y certificación de alimentos. Standard CAC/GL 60-2006. *Codex Alimentarius*.

Fernández, Martín (2010). Tesis de grado titulada “Análisis de Transgénesis mediante PCR de 20 Polentas que se encuentran a la venta en el Mercado Uruguayo”. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Ferreira, Aurora (2013). Comunicación personal – Directora del establecimiento Caprino Alto. <http://www.caprinoalto.com.uy/> - Ruta 86 km 42,5 – Sauce Hilario Cabrera 6790 – Montevideo, Uruguay.

Fung, D. Y. C., Hajmeer, M. N., Kastner, C. L., Kastner, J. J., Marsden, J. L., Penner, K. P., et al. (2001). Meat safety. En: *Meat science applications*. Y. H. Hui, W-K. Nip, R. W. Rogers, & O. W. Young (Eds.), p. 171–205.

Garibay, M. G., Revah, S. & Gómez Ruiz, L. (1993). Productos lácteos. En: *Bioteología Alimentaria*. G. Garibay, Q. Ramírez & López Munguía (Eds.). Cap. 6, p. 153-224.

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

Haenlein, G. F. W. (2002). Lipids and proteins in milk, particularly goat milk. Disponible en: <<http://ag.udel.edu/extension/information/goatmgmt/gm-08.htm>>.

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

Hernández, M., Duplan, M. N., Berthier, G., Tilingom, M. V., Hauser, W., Freyer, R., Pla, M. & Bertheau, Y. (2004). Development and Comparison of Four Real-Time Polymerase Chain Reaction Systems for Specific Detection and Quantification of *Zea mays* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 15, p. 4632–4637.

Holst-Jensen, A., Rønning, S. B., Løvseth, A. & Berdal, K. G. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 375, n. 8, p. 985-993.

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas – Gobierno Bolivariano de Venezuela (2013) [en línea]. *Curso sobre elaboración artesanal de quesos*. <<http://bioteccaprina.inia.gob.ve>>. [Consulta: 2 de agosto de 2013].

James, C. (2011). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. *ISAAA Brief No. 43*. ISAAA: Ithaca, NY.

Johnson A. H. (1974). The composition of Milk. *Fundamentals of Dairy Chemistry*, 2a Ed., AVI Pub. Co. Westport, p. 1-57.

Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Paabo S., Villablanca F. X. & Wilson A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, n. 16, p. 6196-6200.

Kosikowski, F. V. (1988). Enzyme Behaviour and Utilization in Dairy Technology. *Journal of Dairy Science*, n. 71, p. 557-573.

Lenstra, J.A., (2003). DNA methods for identifying plant and animals species in food. *Food authenticity and traceability*. Lees, M. (Ed) p. 34 – 46. CRC Press. FL. USA.

Lockley, A. K. & Bardsley, R. G (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, v. 11, n. 2, p. 67 – 77.

López M., Mallorquín P. & Vega M. (2003). Informe de vigilancia Tecnológica. Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria. *Genoma España*.

Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., & Elke, A. (1999). IUPAC Collaborative Trial Study of a Method to Detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in Dried Powder. *Journal of AOAC International*, 82, pp. 923-928.

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

Martin, A. P. & Palumbi, S. R. (1993). Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings National Academy of Sciences*, n. 90, p.4087-4091. USA.

Martinez Debat, C. & Ehrlich, R. *Método de Detección de especies Animales*. DNPI, Uruguay. Patente de Invención Nº 28351, 2005.

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 Science.*, n. 51 p.143–148.

Miller, Agustín (2011). Tesis de grado titulada “Estudio de métodos moleculares para detección de adulteraciones de Quesos de Cabra con leche de Vaca”. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Miraglia, M., Berdahl, K. G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E. J., Marvin, H. J., Schimmel, H., Rentsch, J., Van Rie, J. P. & Zagon, J. (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, n. 42, p. 1157-1180.

OMS (2002). [en línea] 20 preguntas sobre los alimentos genéticamente modificados (GM). Disponible en:<http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/20questions_es.pdf>.

Ortola-Vidal, A., Schener, H., Rojmyr, M., Lysholm, F. & Knigth, A. (2007). Quantitative identification of plant genera in food products using PCR and Pyrosequencing technology. *Food control*, n. 18, p. 921-927.

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

Peuhkuri, K. (2000). Lactose, lactase, and bowel disorders. Disertación - (Doctorado en Medicina), Faculty of Medicine, Institute of Biomedicine, Helsinki. Disponible en: <<http://ethesis.helsinki.fi>>.

- PIEEP (2005). Manual para la eficiencia de la PyME Quesera. Buenos Aires, Argentina.
- Piñeyro-Nelson, A., Van Heerwaarden, J., Perales, H. R., Serratos-Hernández, J. A., Rangel, A., Hufford, M. B., Gept, P., Garay-Arroyo, A., Rivera-Bustamantes, R. & Álvarez Buylla, E. R. (2009). Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology*, n. 18, p. 750–761.
- Poder Legislativo (2000). Ley N° 17.250. Defensa del consumidor.
- Poder Legislativo (2011). Ley N° 18.792. Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica.
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica (2000). Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: texto y anexos. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.
- Rea, S., Chikuni, K., Branciaro, 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*, n. 68, p.689–698.
- Reglamento (CE) No 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo (28 de enero de 2002). Diario Oficial de las Comunidades Europeas.
- Renner, E. (1997) Efectos de la dieta sobre la digestión de lactosa. *Food Science and Technology International*, v. 3, n. 2, p. 71-79.
- Richardson, C. W. (2004) Let's learn about dairy goats and goat's milk. Oklahoma: Cooperative Extensión Service, Oklahoma State University. (Boletín N° 424).
- Robin, E. D. & Wong, R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology*, n. 36, p.507–13.
- Rose, A. H. (1981). The Microbiological Production of Food and Drink. *Scientific American*, v. 245, n. 3, p. 126-138.
- Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K., & Rasmussen, O. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, n. 17, p. 37-45.
- Sahi, T. (1994) Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 29, suppl. 202, p. 1-20.

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*, n. 230 p. 1350–1354.

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

Scott, R. (1986). *Cheesemaking Practice*. 2da edición, p. 26. Londres, Elsevier.

Sepúlveda, J. & Dri, P. H., (2013) Elaboración de queso de leche de cabra. Ministerio de Agroindustria y Tecnología. Dirección Provincial de Ganadería. Mendoza. <<http://www.ganaderia.mendoza.gov.ar>>.

Taberlet, P., Gielly, L., & Bouvet J. (1992). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, v. 17, p. 1105–1109.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v.28, p. 2731-2739.

Ulberth, F. (2003). Milk and dairy products. *Food authenticity and traceability*. Lees, M. (Ed) p. 363–367. CRC Press. FL. USA.

Vega, S., M. González, R. Gutiérrez, A. Ramírez, G. Díaz, N. Pérez, G. Prado, A. Alberti, H. Esparza, M. Rosado & G. Muñoz (2004). Physical and chemical differences between milk samples of Saanen and Alpine –french goats produced in the México central region. The future of the sheep and goat dairy sectors. *International Dairy Federation*, Zaragoza, España. P. 28-30.

Vega, S., Gutiérrez, R., Díaz, G., González, M., Ramírez, A., Salas, J., Coronado, M. & González, G. (2005). Leche de cabra: producción, composición y aptitud industrial. *Revista Carnilac Industrial*, n. 20, p. 9-18.

Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T. & Itakura, K. (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res*, v. 6, n. 11, p.3543–3557.

ANEXO – Abreviaturas

AAS: Espectroscopia de absorción atómica

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ASO: Autoridad Sanitaria Oficial.

CaCl₂: Cloruro de Calcio

DeVa: Determinación de especies Vegetales en alimentos

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

FAO: Food and Agriculture Organization.

GC: Cromatografía de gases.

GC-C-IRMS: Cromatografía de gases con celda de combustión y espectrometría de masas de razones isotrópicas.

GC-FTIR: Cromatografía de gases asociada a espectrometría de Infrarrojo por transformada de Fourier.

GC-IRMS: Cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas de razones isotrópicas.

GC-MS: Cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas.

GM: Genéticamente modificado.

HLPC: Cromatografía líquida de alta eficacia.

ICP-AES: Espectrometría de plasma acoplada a espectrometría de emisión.

ICP-MS: Espectroscopia de plasma acoplada a espectrometría de masa.

IF: Isoelectroenfoque.

IMM: Intendencia Municipal de Montevideo

IR: Infrarrojo.

IRMM: Institute for Reference Materials and Measurements (Geel, Bélgica).

IRMS: Espectrometría de masas de razones isotrópicas.

ISAAA: Internation Service for the Adquisition of Agri-Biotech Applications.

JRC: Compendium of reference methods for GMO analysis.

LB-IMM: Laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo.

MGAP: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

MeDeA: Método de determinación de especies Animales en Alimentos.

NaCl: Cloruro de Sodio.

NIH: National Institute of Health.

NMR: Resonancia magnética nuclear.

OGM: Organismo genéticamente modificado.

OVM: Organismo vivo modificado.

PAGE: Poliacrylamide gel electroforesis.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PIEEP: Proyecto Incremento de la Eficiencia Energética y Productiva en la PyME Argentina.

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

UE: Unión Europea.

UV: Ultravioleta.

AGRADECIMIENTOS

A Claudio, por haberme incorporado a los proyectos del laboratorio y confiar en mi trabajo.

A Mailen, por llegar a trabajar siempre con una serenidad contagiosa y ser un pilar fundamental en este proceso, desde lo técnico y lo personal.

A mis compañeros de laboratorio, por las oportunas sugerencias en momentos cruciales.

A mis padres y mi hermano, por el apoyo e interés constantes en todo este camino.

A mis amigos, por motivarme y aguantarme las locuras.

A Nicolás, por ser mi cable a tierra.