

“Análisis de especies animales y vegetales, incluyendo transgénicos, en matrices alimentarias de consumo masivo”



Fabiana San Martín

Tutor: Dr. Claudio Martinez Debat

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco principalmente a mi familia por haberme acompañado y apoyado todos estos años, especialmente a mis padres y a mi hermano, que son mis pilares y mi ejemplo. A mi madre, por el increíble apoyo y sacrificio. A mi padre por ser mi sostén y por darme la mano cuando sentí que este camino terminaba. A mi hermano, por estar siempre ahí para aconsejarme y ayudarme.

Un agradecimiento especial a Claudio, el tutor de esta tesis, por haberme dado la oportunidad de trabajar con él, por la gran paciencia y los conocimientos brindados.

A Mailén, por su amistad, su enorme disposición y por haberme enseñado a dar mis primeros pasos en el laboratorio.

A mis compañeros de la Sección Bioquímica por la buena onda de cada día.

A mis amigos y compañeros de estudio que me acompañaron y ayudaron a llegar al final de este camino, les agradezco la comprensión, los consejos y el ánimo.

RESUMEN:

La sustitución de ingredientes por otros más económicos es algo frecuente. Estos ingredientes de menor valor pueden provenir de la especie declarada o bien de otras especies. En particular, en los productos cárnicos, es muy común la sustitución de la carne con tejidos de especies no especificadas que incluyen despojos, carcazas y tejido conjuntivo. Asimismo, las hamburguesas de carne suelen “complementarse” con pasta de soja, que es fácilmente asequible a precios muy bajos. Por este motivos, nos propusimos analizar la presencia de la especie *Glycine max* en diversos alimentos de consumo masivo, principalmente hamburguesas de carne y alimentos con pasta de soja, obtenidos en comercios locales de nuestro país. También nos planteamos determinar cualitativamente la composición de estas muestras en especies animales, en particular *Bos taurus* y *Gallus gallus*.

Los Organismos Genéticamente Modificados o transgénicos son organismo en cuyo genoma se han insertado, mediante técnicas de ADN recombinante, determinados genes de otros organismos. Estos genes confieren características que permiten incrementar la producción y disminuir sus costos. El desarrollo de esta tecnología ha sido explosivo a nivel mundial y nuestro país no fue la excepción. Uruguay ocupa el décimo lugar entre los 17 países considerados como superproductores de granos transgénicos (ISAA, 2012) y si tomamos en cuenta el área relativa de cada país Uruguay lidera la tabla. Sin embargo, los transgénicos han sido, y siguen siendo, objeto de profundo debate y aún no se ha alcanzado un consenso sobre si estas tecnologías son seguras. Además, recientemente, en nuestro país se ha aprobado, y se está reglamentando, un decreto para el etiquetado de productos transgénicos; por lo que resulta de vital importancia el desarrollo de técnicas moleculares que permitan detectar la presencia de este tipo de organismos en los alimentos. Así, nos propusimos determinar, en las matrices elegidas, la presencia u ausencia de transgénicos y en particular del evento de soja GTS 40-3-2, que es el principal cultivo transgénico en nuestro país y el mundo.

Para cumplir con los objetivos planteados, se llevaron a cabo métodos de extracción de ADN puestos a punto en nuestro laboratorio. Con los ADN obtenidos se realizaron amplificaciones por PCR a tiempo final cuyos resultados se resolvieron en geles de poliacrilamida. Para identificar especies animales, en particular vaca y pollo, se utilizaron

los métodos de Matsunaga (Matsunaga *et. al.*, 1999) y Bravi (Bravi *et. al.*, 2004). Ambas metodologías se basan en la amplificación del gen mitocondrial *cytb*. Para determinar la presencia de soja en las muestras analizadas se llevo a cabo una estrategia de amplificación por PCR utilizando cebadores dirigidos al gen endógeno de soja que codifica para la Lecitina de soja. Mientras que para el análisis de transgénicos se llevaron a cabo dos métodos de rastreo de elementos comunes presentes en varios eventos transgénicos, el promotor *p-35S* y el terminador *t-nos*. Asimismo, se realizó una amplificación utilizando cebadores específicos para detectar la construcción de soja *RR*.

Los resultados obtenidos demuestran que el método utilizado para la extracción de ADN resultó apropiado, ya que se obtuvieron cantidades muy altas de ADN, que si bien tienen una pureza por debajo del óptimo, resultaron eficaces ya que todos los ADN extraídos sirvieron como molde de amplificación. Con las estrategias empleadas para la detección de especies animales se comprobó que, la especie *Bos taurus* está ausente en todas las muestras basadas en soja y presente en las 10 muestras de hamburguesas de carne. Además en una de estas muestras analizadas se detectó la presencia inesperada de *Gallus gallus* y en 5 de las hamburguesas de carne se detectó la presencia de soja.

Todos los ensayos de transgénesis dieron negativos para las 5 muestras que no contienen *Glycine max*. De las dos muestras certificadas de soja transgénica una es un caso de fraude alimentario ya que contiene el evento GTS 40-3-2 y la otra verdaderamente contiene lo que declara. Además de esta, otras dos muestras que no declaran la ausencia de OGMs, podrían no contener transgénicos ya que se obtienen resultados dudosos para el rastreo de *p-35S* y negativos para el resto de los análisis. Las 9 muestras restantes, contienen el evento GTS 40-3-2.

INDICE:

CARÁTULA.....	1
AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	3
INDICE	5
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN.....	9
5.1 Fraudes Alimentarios	
5.1.1 Fraudes alimentarios y derechos del consumidor	
5.1.2 Fraudes alimentarios en productos cárnicos y de soja	13
5.2 Transgénicos	15
5.2.1 Situación en Uruguay.....	16
5.2.2 Etiquetado de transgénicos	19
5.3 Metodologías disponibles para el análisis de alimentos.....	23
5.3.2 Detección e indentificación de OGMs:	26
5.3.2.1 Métodos de Rastreo:	29
5.3.2.2 Métodos específicos de gen:	30
5.3.2.3 Métodos específicos de construcción:	31
5.3.2.4 Métodos específicos de evento:	32
5.3.3 Soja <i>Roundup Ready</i> y su detección:	
OBJETIVOS	35
6.1 Objetivo general	
6.2 Objetivos específicos	
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS	38
8.1 Descontaminación:	
8.2 Muestras de partida:	
8.3 Extracción de ADN por Método Dellaporta modificado:	39
8.4 Obtención de ADNs control:	40
8.4.1 Extracción de ADN a partir de hígado de pollo:	41
8.5 Calidad y cantidad del ADN extraído:	
8.5.1 Análisis espectrofotométricos:	
8.5.2 Electroforesis en geles de agarosa:	42
8.6 Amplificación por PCR a tiempo final:	
8.6.1 Detección de especies animales:	
8.6.1.1 Método de Matsunaga:	43
8.6.1.2 Método de Bravi:	45
8.6.2 Detección de especie vegetal:	
8.6.3 Detección de transgénicos:	46
8.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	48
8.8 Secuenciado de productos de amplificación:	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
9.1 Extracción de ADN:	
9.1.1 Cuantificación y pureza: Nanodrop	
9.1.2 Calidad del ADN:	53
9.1.3 Controles pollo:	56
9.2 Amplificación por PCR:	57
9.2.1 Matsunaga para detectar <i>Bos Taurus</i> :	58
9.2.2 Matsunaga para detectar <i>Gallus gallus</i> :	61
9.2.3 Método de Bravi:	63
9.3 Secuenciación de la muestra 5:	65
9.2.4 Detección de soja:	67
9.2.5 Detección de transgénicos:	70
9.2.5.1 Rastreo del terminador <i>t-nos</i> :	
9.2.5.2 Rastreo del promotor 35 S:	72
9.2.5.3 Identificación del evento GTS 40-3-2:	74
9.4 Resultados finales	78
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS:	81
10.1 Extracciones de ADN:	
10.2 Análisis de especies por PCR:	82
10.3 Análisis de transgénicos por PCR:	83
BIBLIOGRAFÍA.....	86
APÉNDICE.....	93

ABREVIATURAS:

Abs	- Absorbancia
AcOK	- Acetato de Potasio
ADN	- Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	- ADN mitocondrial
ARN	- Ácido ribonucleico
ARNasa	- Ribonucleasa
CAI	- Comité de Articulación Institucional
CERV	- Comisión de Evaluación del Riesgo de Vegetales Genéticamente Modificados
CGR	- Comisión para la Gestión del Riesgo
c.s.p	- Acrónimo cantidad suficiente para
CYTB	- Citocromo b
DINAMA	- Dirección Nacional de Medio Ambiente
dNTP	- Desoxi Nucleotido Tri-Fosfato
EDTA	- Acrónimo del inglés Ácido EtilenDiaminoTetraacético
EEUU	- Estados Unidos de América
EFSA	- Acrónimo del <i>European Food Safety Authority</i> , (Autoridad europea de seguridad alimentaria)
ELISA	- Acrónimo del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EtOH	- Etanol
FDA	- Acrónimo del inglés <i>Food and Drug Administration</i> (Administración de alimentos y drogas)
GM	- Genéticamente Modificada
GMDD	- Acrónimo del inglés <i>GMO Detection Method Database</i> (Base de datos de métodos de detección de Organismos Genéticamente Modificados)
GNBio	- Gabinete Nacional de Bioseguridad
HPLC	- Acrónimo del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alto rendimiento)
ISAA	- Acrónimo del inglés <i>International Service for the Acquisition of Agrobiotechnological Applications</i> (Servicio internacional de adquisición de aplicaciones agro-biotecnológicas)
JRC	- Acrónimo del inglés <i>Joint Research Center</i> (Centro de investigación unido).
mARN	- ARN mensajero
mg	- Miligramo
MGAP	- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
MgCl₂	- Cloruro de Magnesio

mL - Mililitro

MPM - Marcador de Peso Molecular

MVOTMA- Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente

NaCl - Cloruro de Sodio

NaOH - Hidróxido de Sodio

NCBI - National Center for Biotechnology Information

ng - Nano gramos

OGM - Organismo Genéticamente Modificado

on - del inglés overnight (toda la noche)

pb - Pares de bases

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

RAPD - Acrónimos del inglés *Random Amplification of Polimorphic DNA* (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico)

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

rpm - Revoluciones por minuto

rtPCR - Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real

PCSB - Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología

SDS - Acrónimo del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate* (dodecilsulfato sódico)

Soja RR - Soja *Roundup Ready*

UE - Unión Europea

UV - Ultravioleta

μ - Microlitros

INTRODUCCIÓN:

5.1 FRAUDES ALIMENTARIOS:

5.1.1 Fraudes alimentarios y derechos del consumidor:

Los alimentos adulterados son aquellos que han sido modificados de forma que presentan características organolépticas (color, olor, sabor, textura), composición química o valor nutritivo que no coinciden con la información en su etiqueta. Los alimentos se modifican para variar su composición, peso, volumen, o para encubrir algún defecto de elaboración. Si bien las discrepancias entre el contenido de la comida y las etiquetas pueden deberse a la contaminación inintencional durante el procesado, (Yman *et al.*, 1994) de forma frecuente estas prácticas sirven propósitos económicos. (Macedo-Silva *et al.*, 2001).

Los fraudes alimentarios son tan antiguos como el arte de comprar y vender alimentos por dinero. En la antigua Roma existían leyes prohibiendo la adulteración de vinos con sabores y colores. Una de las primeras investigaciones acerca de la autenticidad de la comida fue realizada por Arthur Hill Hassal en 1861. Empleó la microscopia para investigar la autenticidad del café, un producto caro en su época. Sus resultados reportan que 31 de las 34 muestras que analizó contenían adulterantes como azúcar quemada y trigo (áJohn, 1998). Desde entonces, la adulteración de los alimentos ha pasado de ser un simple medio para cometer fraude a un negocio extremadamente sofisticado, lucrativo y difícil de detectar ya que de forma frecuente, estos alimentos tienen la apariencia y muchas de las características del producto legítimo, con componentes que son bioquímicamente similares a los que reemplazan.

Hay varios tipos de fraudes alimenticios: La sustitución de ingredientes por otros de apariencia similar pero más baratos, la adulteración de la comida con otro ingrediente base, como el agua, la no declaración de procesos como el congelado, o la irradiación de alimentos y la sobredeclaración de la cantidad de un ingrediente. Todas estas formas de adulteración son recurrentes en particular con alimentos de alto valor comercial, ya que el precio diferencial en el producto premium aumenta las ganancias económicas de los productores inescrupulosos (Woolfe & Primrose, 2004).

La problemática de la adulteración se encuentra generalizada habiéndose reportado fraudes en prácticamente todos los sectores de la industria alimentaria. En un periodo de 3 años, surgieron 20 ocasiones en Suecia donde las discrepancias entre las etiquetas de la comida y su contenido fueron confirmadas (Yman *et al.*, 1994). Ejemplos de ello son la sustitución de sémola de trigo por trigo común, la de aceite de oliva por mezclas de otros aceites y la sustitución de algunas especies de peces por otras. También se han encontrado especies animales no declaradas en productos cárnicos (Ballin, 2010), soja en diferentes productos alimenticios (Woolfe & Primrose, 2004), la adulteración de dulces y salsas con manzana, y la de especias con otros vegetales de menor valor (Arleo *et al.*, 2012)

Muchos de estos fraudes han adquirido conocimiento público, provocando justificados temores en relación a la inocuidad de los alimentos. El interés de los consumidores en relación a los alimentos que ingieren es cada vez mayor y el etiquetado preciso es importante para que el consumidor tenga información sobre la cual basar su decisión. La elección de un producto por sobre otro puede reflejar el estilo de vida de individuos vegetarianos, veganos y aquellos que prefieren consumir alimentos orgánicos. También tienen especial interés por el etiquetado veraz, aquellas personas con dietas especiales, individuos alérgicos, intolerantes a la lactosa y con enfermedad celíaca. La descripción fraudulenta del contenido de los alimentos también tiene el potencial de ofender las costumbres religiosas de los hindúes que no comen carne vacuna, así como las de los musulmanes y judíos ortodoxos que consideran inaceptable consumir alimentos no kosher o no-halal respectivamente, especialmente ingredientes derivados de cerdo (Sumar & Ismail, 1995).

El requerimiento para la identificación de especies también está asociado a la prohibición del consumo de ciertas especies animales bajo protección por peligro de extinción (Spychaj, Mozdziak & Pospiech, 2009). Asimismo, la adulteración fraudulenta de los alimentos puede suponer un grave riesgo para la salud de los consumidores, dado que el alimento puede contener sustancias nocivas; ejemplos de ello han sido la sustitución de especias por óxido de plomo y la adición de etilenglicol como endulzante del vino en Austria (áJohn, 1998). Además, los constituyentes no declarados en los alimentos también pueden provocar reacciones alérgicas inesperadas para el consumidor. En 1992,

en Suecia falleció una niña de un ataque de asma luego de comer una hamburguesa que contenía solo un 2.2% de proteína de soja (Foucard & Malmheden, 1999).

Si bien las reacciones anafilácticas fatales son raras y la gran mayoría de los adulterantes (agua, azúcar, proteínas vegetales...) no constituyen un riesgo grave para la salud; los consumidores deberían poder tener la seguridad y la confianza de que cuando compran un producto o ingrediente específico están recibiendo aquello por lo que pagaron y no un material adulterado (Dean, Murphy & Downey, 2006). Además del perjuicio económico, es injusto que el consumidor desconozca lo que ingiere.

La descripción fraudulenta de los alimentos no solo engaña a los consumidores; los comerciantes minoristas e incluso los fabricantes y productores de la industria alimentaria deben ser muy cuidadosos al verificar la calidad de productos y materias primas que adquieren. El etiquetado fidedigno también es importante para evitar la competencia desleal entre productores (Ballin, Vogensen & Karlsson, 2009), ya que aquellos que “estiran” sus productos con rellenos cuestionables abaratan los costos y aumentan su margen de ganancia generando una ventaja competitiva frente a productores honestos (Sumar & Ismail, 1995)

En 1995, 134 años después de las investigaciones de Hassal, se llevó a cabo un estudio similar con café instantáneo en Inglaterra, encontrando que el 15% de los café no eran auténticos. Esto demuestra que la problemática de la adulteración de alimentos es recurrente y no se marcha sola. Si hay potencial de obtener una ganancia ilegal, solo la vigilancia continua puede asegurar que los fraudes no se cometan (áJohn, 1998).

Es por este motivo que la mayoría de los países desarrollados han introducido leyes que regulan el etiquetado de alimentos. Si bien la legislación de etiquetado y composición de los alimentos pueden variar de un país a otro, la tendencia es exigir que los productores y exportadores puedan asegurar la inocuidad del producto desde el lugar de origen hasta el punto de consumo. Ejemplo de esto es la Unión Europea, que desde 1979 cuenta con normativas para regular el etiquetado y trazabilidad de los alimentos. En el 2000, la directiva original y sus modificaciones se consolidaron en el reglamento 2000/13/CE que

se centra en la prevención de las prácticas engañosas y la adulteración de los alimentos, incluyendo una sección de rotulado de la carne de vacunos.

Nuestro país no es la excepción. La Ley 17250 sobre la Defensa del Consumidor establece en el Capítulo II, Artículo 6° que los consumidores tienen derecho a “la libertad de elegir... a información suficiente, clara y veraz... y a la protección contra los métodos desleales en el suministro de productos y servicios”. Dicha ley también establece en el capítulo V, Artículo 17° que: La oferta de productos debe brindar información clara y fácilmente legible sobre sus características, naturaleza, cantidad, calidad, composición, garantía, origen del producto... y, según corresponda, el plazo de validez y los riesgos que presente para la salud y seguridad de los consumidores.

Además, el etiquetado de los alimentos también está contemplado en la Ordenanza Bromatológica Municipal de la ciudad de Montevideo. Esta establece que salvo cuando se trate de alimentos de un único ingrediente deberá figurar en el rótulo una lista de ingredientes, que cumpla determinadas características entre ellas “todos los ingredientes deberán enumerarse”.

Las exigencias en las normativas de seguridad alimentaria se trasladan al sector productivo de modo que para poder vender productos, y más aún para poder exportar a mercados internacionales, se deben de cumplir normas de trazabilidad y etiquetado cada vez más estrictas. Los fabricantes deben proporcionar y confirmar la autenticidad y el origen de los productos alimenticios y sus componentes. En este contexto, se vuelven esenciales los análisis de identificación de especies y autenticidad de alimentos.

Además la trazabilidad es un mecanismo de seguridad alimentaria a nivel global. El conocer la procedencia de un producto y poder seguir el movimiento de los alimentos a lo largo de las cadenas de procesado, distribución y comercialización, permite un control más efectivo en los casos de crisis alimentarias y facilita la identificación de las causas y las medidas a tomar; como el retiro del producto del mercado.

5.1.2 Fraudes alimentarios en productos cárnicos y de soja:

Los fraudes alimentarios con productos cárnicos resultan muy atractivos a productores inescrupulosos, no solo por su alto valor comercial sino también por la relativa facilidad con la que se pueden adulterar. Los fraudes con los productos cárnicos pueden ser agrupados en cuatro grandes categorías: origen de la carne, sustitución de especies, procesamiento/tratamiento y el agregado de aditivos (Ballin, 2010). Dentro de cada área hay múltiples posibilidades de engaño al consumidor. Por ejemplo el precio de la carne puede variar con el sexo, la raza y el origen geográfico del animal; también con la edad en que se los sacrifica, el tipo de ración de engorde y el uso de drogas veterinarias (producción orgánica vs convencional). La información de todos estos aspectos se incluye convencionalmente dentro de origen de la carne, y al igual que como ocurre con la información del tratamiento y procesado (irradiación, congelado-descongelado), puede ser alterada para ganar un beneficio económico.

También son muy comunes los fraudes alimentarios que involucran la sustitución de especies y el agregado de aditivos no cárnicos para “complementar” la carne y aumentar su rendimiento. Mezclas de carne con especies no declaradas han sido documentadas tanto en carnes crudas como procesadas (Hsieh, Woodward & Ho, 1995). La sustitución de una especie animal por otra es algo relativamente sencillo dado que el tejido crudo de muchas especies es similar en apariencia. Los consumidores tienen dificultad a la hora de identificar y evaluar la calidad de la carne y esto resulta en inseguridad e insatisfacción (Grunert, Bredhal & Brunso, 2004). Además, una vez que el procesado de la carne remueve las características morfológicas de los músculos, incluso a los ojos expertos les resulta difícil distinguir un tipo de carne de otro. Las adulteraciones resultan aún más fáciles de ocultar cuando la carne llega a los comercios minoristas y a los restaurantes ya que las pequeñas diferencias se pierden casi por completo. Por esta razón la sustitución de la carne con especies no especificadas, usualmente de menor calidad, es la forma más común de adulterar la carne en la industria (Meza-Marquez, Gallardo & Osorio, 2010).

La sustitución fraudulenta de los productos cárnicos también puede involucrar tejidos ya sea de la especie declarada o de otras especies. Los tejidos más comunes utilizados para estos fines incluyen los despojos, las carcazas, la sangre y el tejido conjuntivo. Además, la grasa vegetal puede sustituir a la animal, o la grasa de una especie animal puede ser sustituida por la de otro. (Balin, 2010).

Desde 1960, la proteína de soja, ha atraído la atención por ser fácilmente asequible a precios muy económicos. Actualmente, esta proteína vegetal es de las más usadas en la sustitución fraudulenta por proteínas animales (Meza-Marquez, Gallardo & Osorio, 2010); no solo por su valor biológico sino también por su capacidad de hidratación, por sus propiedades emulsionantes y estabilizadoras y porque mejora la textura del producto final (Macedo-Silva *et al.*, 2001). Las proteínas de maíz, la melamina y la urea también han sido utilizadas de forma efectiva como adulterantes de productos cárnicos.

La prevalencia de los fraudes alimentarios es difícil de medir. Sin embargo, hay numerosos ejemplos del falso etiquetado y de su abundancia en los productos cárnicos. En EEUU, Hsieh y colaboradores (Hsieh, Woodward & Ho, 1995) analizaron más de 900 muestras de carne, tanto cruda como cocida, encontrando que un 16,6% de estas muestras contenían más de un 1% de especies no declaradas. Sus resultados también indicaron que se cometen más fraudes con carnes cocidas (22,9%) que con crudas (15,9% de las muestras analizadas). En una investigación más reciente (Ayaz, Ayaz & Erol, 2006) se realizaron inmunoensayos en 100 productos cárnicos provenientes de Turquía, encontrando especies animales no declaradas en el 22% de los casos.

La adulteración de las carnes y productos cárnicos por carnes de menor costo pertenecientes a otras especies también ha sido reportada en España (Silvestre, 1995), México (Flores-Munguia, Bermudez & Vazquez, 2000), Suiza (Anon, 2001), Australia, India, Kenia (Barai *et al.*, 1992) y en el Reino Unido (Anon, 1996) entre otros.

En particular algunos investigadores han trabajado con hamburguesas. En México, en el año 2000 Flores-Munguia y colaboradores, utilizando ensayos de inmunodifusión en agar, identificaron especies aviares, bovinas, porcinas y equinas en carnes ligeramente procesadas. Encontraron carne equina no declarada en 9 de las 23 hamburguesas crudas y carne porcina en 5 de las 17 salchichas mexicanas analizadas (Flores-Munguia, Bermudez & Vazquez, 2000). De forma más reciente, en Brasil, se determinó por ELISA indirecto, el contenido de soja en 39 hamburguesas de carne vacuna, de cerdo y de pollo. El 30,8 % de la muestras analizadas excedió los límites de especificación, considerando que en Brasil la legislación permite un máximo de 7,5% de proteína (peso seco) de soja en hamburguesas (Macedo-Silva *et al.*, 2001).

En Uruguay, el Reglamento Bromatológico Nacional (Decreto N° 315/994) contiene un capítulo exclusivamente dedicado a Carnes y derivados (Capítulo 13). En él se establece por ejemplo que la carne picada debe ser preparada “por procedimiento mecánico sin aditivo alguno”. La sección 3 de este capítulo dedicada a Chacinados establece las especies componentes y los aditivos admitidos para las distintas variedades. En particular las hamburguesas “cuya materia prima es carne de cerdo o vacuno picada”, no puede tener un contenido de grasa superior al 20%, se permite el agregado o no de sal, especias y condimentos así como aditivos autorizados. Sin embargo, no se especifica la cantidad máxima de estos aditivos que se puede utilizar, por lo que varios de ellos, a saber: las grasas comestibles, almidones y vegetales; podrían ser usados para “complementar” hamburguesas y otros productos cárnicos, sin cometer un fraude.

Dado el alto valor agregado de los productos cárnicos y la facilidad con la que se pueden adulterar, los productos cárnicos han sido de los primeros en incorporar métodos de trazabilidad como dispositivos en las orejas de los animales y códigos de origen en los productos cuando llegan al consumidor.

5.2 TRANSGÉNICOS:

El cultivo de transgénicos es la principal aplicación agrícola de la biotecnología moderna. La era de este tipo de alimentos comenzó en 1994 cuando la FDA (Food and Drug Administration, EEUU) aprobó la comercialización del primer cultivo GM, el tomate *Flavr Savr*. Desde entonces, el desarrollo de estos cultivos a nivel mundial ha sido explosivo. Según las últimas estadísticas del ISAA (*International Service for the acquisition of Agri-Biotech Applications*), el área global sembrada con estos cultivos ha aumentado 100 veces desde las 1.7 millones de hectáreas sembradas con OGMs en 1996 hasta las 170,3 millones de hectáreas en 2012. Durante esta zafra, (2011-2012), 17,3 millones de agricultores en 28 países cultivaron transgénicos; de los cuales 20 son países en vías de desarrollo. Por primera vez, en 2012, los países en desarrollo cultivaron más transgénicos (52%) que los países industrializados (48%) (James, 2012).

Los principales países productores de transgénicos se muestran en la tabla 1 del Apéndice; EEUU sigue siendo el líder, con 69.5 millones de Has; seguido por Brasil y Argentina. Brasil, por cuarto año consecutivo, ha sido el motor del crecimiento global con

un incremento mayor a cualquier otro país, un 21% más que en 2011 (James, 2012). En esta lista se sigue notando la ausencia de países europeos y de muchas naciones africanas como productores significativos (Mannion & Morse, 2013). Esto, sumado a las altas tasas de adopción que ya han alcanzado los principales productores (James, 2012) hacen que las tasas anuales de crecimiento comiencen a disminuir, 6% para el periodo 2011-2012, en comparación con el 10% alcanzado en el periodo 2009-2010.

También es de hacer notar que la tendencia al alza en el área sembrada, no se mantuvo en lo que se refiere a las variedades cultivadas. En los 18 años que tiene este tipo de cultivos en el mercado, se han diseñado numerosas variedades genéticamente modificadas de alfalfa, calabaza, tomate, papaya, canola, papa, álamo, remolacha y pimiento dulce etc... Sin embargo, al presente, solo unas pocas variedades de cultivos han sido plantadas en gran extensión. En términos de área y valor, los cereales GM, principalmente maíz, canola y soja, así como el algodón son los más importantes (Apéndice tabla 2) y todos ellos han estado presentes en el mercado desde 1995/1996 (Mannion & Morse, 2013). En esta tabla puede verse que la soja GM ha sido la más cultivada, más del 50% de las plantaciones de soja en el mundo son de soja GM y la soja *RR* de Monsanto es el cultivo GM más importante en el mundo (Berdal & Jolst, 2001). Las características más difundidas han sido la tolerancia a herbicidas, la resistencia a insectos y el retraso en la maduración de los frutos, aunque la tendencia en estos últimos años ha sido la de sembrar cultivos con características acumuladas (apilados). Más del 25% de las Has sembradas en 2012 fueron de este tipo de cultivos (James, 2012).

5.2.1 Situación en Uruguay:

Existen en el mundo 17 países considerados como superproductores de granos transgénicos (ver Apéndice tabla 1) y Uruguay está entre ellos, en el décimo lugar; esto es considerando el área total plantada con cultivos GM. Si tomamos en cuenta el área relativa de cada país Uruguay lidera la tabla.

En Uruguay se cultivan transgénicos desde 1996, cuando el MGAP aprobó el primer evento transgénico para el cultivo de la soja MON 40-3-2, resistente al herbicida glifosato. En el año 2001, Uruguay firma el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (PCSB); Este convenio es el principal acuerdo internacional vinculado a los

OGMs; reconoce el potencial de la biotecnología moderna y busca reducir al mínimo sus posibles riesgos para el medio ambiente y la salud humana. Hace especial énfasis en garantizar que los OGMs sean manejados, transportados y usados de forma segura y en que los países evalúen el riesgo de los OGMs que van a ser introducidos intencionalmente al medio ambiente. Si bien Uruguay no ha ratificado este protocolo, sí acompañó de cerca la negociación que llevó a su redacción acompañando este proceso internacional con decisiones a nivel nacional (Proyecto DINAMA-PNUMA-FMAM, 2007). Como ejemplo puede señalarse que en el mismo año de aprobación del Protocolo de Cartagena se promulgó el decreto 249/000 por el cual se creó la Comisión de Evaluación de Riesgo de Vegetales Genéticamente Modificados (CERV). El Decreto 249/000 marcó el primer antecedente de una política estatal de bioseguridad, ya que en él se estipula la realización de evaluaciones de riesgo previas a cualquier autorización.

En 2003 y 2004 se autorizan, por resolución ministerial conjunta del MEF y MGAP los eventos de maíz transgénico MON 810 (de Monsanto) y Bt11 (de Syngenta) ambos con resistencia a larvas de lepidópteros. Luego de la aprobación de estos eventos, el MVOTMA, en las resoluciones ministeriales 236/276/2003 y 290/2004 establece las condiciones de siembra para los mismos. Esta reglamentación incluye la consolidación de un registro que permita identificar quienes importan, exportan, distribuyen adquieren y siembran cultivos transgénicos. Asimismo, también se establece que un 10% del área sembrada ha de ser cultivo no transgénico (zonas de refugio) con distancias de separación entre un tipo de cultivo y otro de al menos 250 mts.

En Agosto del 2006, ante denuncias de irregularidades en la comercialización de semillas y por considerarse que estaba pendiente una normativa destinada a minimizar riesgos para la biodiversidad y el ambiente, autoridades del MVOTMA y el MGAP resuelven suspender el uso, producción y comercialización de semillas de maíz dulce genéticamente modificado. En enero de 2007 se aprueba el Decreto 037/007 que suspende transitoriamente el tratamiento y aprobación de nuevos eventos y establece un plazo de 18 meses para elaborar una nueva normativa relativa a Bioseguridad.

El marco regulatorio vigente lo estableció el Decreto Presidencial N°353/008, del 21 de julio de 2008, que derogó al 037/007 levantando la moratoria que prohibía la entrada de

nuevos eventos al Uruguay para su siembra. Este decreto crea una nueva estructura para la bioseguridad en vegetales y sus partes genéticamente modificadas. Los nuevos lineamientos incluyen instancias de participación ciudadana y consulta pública así como una política de coexistencia regulada entre vegetales GM y no GM, aunque con respecto a los alimentos deja a libre elección el etiquetado en el producto final. El decreto también genera una nueva estructura institucional que incluye a la Comisión para la Gestión del Riesgo (CGR), al Comité de Articulación Institucional (CAI), a la Evaluación de Riesgo en Bioseguridad (ERB) y al Gabinete Nacional de Bioseguridad (GNBio) encargado de autorizar (o rechazar) las nuevas solicitudes de eventos transgénicos.

Desde que se estableció el GNBio se han recibido y evaluado más de 30 solicitudes y hay actualmente 16 en proceso de evaluación, ya sea para uso comercial, evaluación de cultivares, uso en investigación o para semillas de exportación (ver Apéndice Tabla 4). A mediados del 2011 fueron aprobados para cultivo comercial cinco eventos de maíz (GA21, GA21XBT11, TC1507, NK603, y MON810XNK603) que se sumaron a la soja *Roundup Ready* y a los dos eventos ya liberados de maíz (MON 810 y BT11). En setiembre de 2012, se aprobaron cuatro nuevos eventos de maíz (TC1507XNK603, BT11XMIR162XGA21, MON89034XTC1507XNK603 y el Maíz dulce) y tres de soja: el apilado RR2YBt que contiene los genes *cry1Ac* de protección contra lepidópteros y *cp4epsps* que confiere tolerancia al glifosato; y los eventos A2704-12 y A5547-127 ambos con resistencia al herbicida glufosinato de amonio. Estos tres eventos de soja también se encuentran en el registro de OGMs autorizados por la UE (disponibles en: http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm).

Además, se encuentran actualmente en proceso de evaluación para uso comercial tres eventos de maíz (MON89034XMON88017, BT11XMIR162XMIR604XGA21 y MON89034XNK603XTC1507XDAS40278-9) y tres de soja (BPS-CV127-9, DAS44406-6 y MON89788XMON87708). El evento de soja *bps-cv 127-9*, de Basf contiene el gen *csr* que confiere resistencia a los herbicidas imidazolinas. Tiene la particularidad, junto al maíz dulce, de ser los únicos eventos presentados para comercialización sin ser previamente evaluados para investigación o exportación. También se encuentran actualmente en evaluación para uso en investigación un evento de papa y uno de tomate.

En cuanto a las áreas de siembra, en Uruguay la soja pasó de ser marginal a convertirse en el principal rubro agrícola en menos de 10 años. Este fenómeno se dio particularmente en el litoral Uruguayo (Colonia, Soriano, Paysandú y Río Negro), caracterizado históricamente por un manejo convencional (Hernandez *et al.*, 2001). En el período 1990-1999, esta oleaginosa representaba en promedio apenas un 5% del área sembrada de los cultivos de verano. Actualmente, la soja es el principal cultivo agrícola del país cubriendo más del 85% del área con cultivos agrícolas de verano en las últimas temporadas. Este proceso fue favorecido por los altos precios internacionales del grano y por la llegada y generalización de la siembra directa y las semillas transgénicas (Arbeletche & Carballo, 2006). Con la adopción del nuevo paquete tecnológico, la soja ha sufrido una explosión en el área de siembra y un incremento en los volúmenes de producción por hectárea. Actualmente, cerca del 100% del área cultivada con soja se siembra con soja transgénica y todos los eventos GM aprobados para semillas de exportación son de soja.

El otro tipo de cultivo GM para el que hay liberaciones comerciales en Uruguay es el maíz. Si bien desde la introducción de los cultivos tecnológicos, la superficie plantada con maíz no ha incrementado de forma dramática como es el caso de la soja; el porcentaje de adopción del maíz transgénico ha ido en aumento; alcanzando casi el 90% del área total de maíz sembrado (157.000 Hts en 2012). Considerando que las resoluciones 236/276/2003 y 290/2004 establecen un área del 10% de maíz no GM como refugio; prácticamente todo el maíz plantado en Uruguay es transgénico.

5.2.2 Etiquetado de transgénicos:

Desde la aparición de los alimentos transgénicos en el mercado, se ha instaurado y aún continúa un profundo debate acerca de su seguridad. La evidencia hasta ahora no señala ningún problema específico insuperable, pero tampoco puede disipar las dudas (Ferber, 1999). Hay varias posturas, todas ellas válidas y justificadas. Si bien se producen y comercializan millones de productos con componentes transgénicos, es indiscutible el hecho de que la aceptación de estos cultivos es todavía muy limitada.

En este contexto se hace extremadamente necesario respetar la libertad de elección de los consumidores y proporcionarles información fidedigna y veraz en la cual puedan basar sus decisiones. Es así que, el principio de protección de la autonomía individual en que se

basan la mayoría de las normativas de etiquetado, busca proteger la libertad de los ciudadanos de elegir los productos que consumen. El objetivo principal de los requerimientos de etiquetado obligatorio es proveer a los consumidores de información y de libre elección (Gruere & Rao, 2007).

Sin embargo, en la elaboración de las normativas, las autoridades no solo se basan en los derechos de los consumidores sino también en la capacidad del país de hacer cumplir las normativas (el seguimiento, fiscalización y control de que la legislación se cumple, y de las sanciones cuando se comprueba que las normativas no se respetan) y en los intereses comerciales de los sectores agroindustriales y alimentarios, que en la mayoría de los casos en que el etiquetado obligatorio se ha implementado han visto sus productos desaparecer del mercado (Marchant, Cardineau & Redick, 2010; Carter & Gruere, 2003)

Los primeros requisitos de etiquetado de alimentos transgénicos fueron introducidos en 1997 por la Unión Europea con el Reglamento EC N°258/97 como una aplicación del principio de precaución (Carter & Gruere, 2003). Desde entonces, la UE ha establecido varias normas supranacionales con el fin de “proteger la salud humana y animal a través de una estricta evaluación de la seguridad de los alimentos GM previo a su comercialización y asegurando un etiquetado claro que responda a las preocupaciones de los consumidores” (European Commission, Existing rules on GM food & animal feed). Actualmente, en cuanto a la evaluación de su seguridad, los alimentos tecnológicos se contemplan en la directiva 2001/18/CE con aspectos adicionales adoptados de forma más reciente en el Reglamento 1829/2003/CE, sobre alimentos y piensos genéticamente modificados y el 1830/2003/CE, sobre la trazabilidad y etiquetado. Estas normativas establecen que se indique la presencia de OGMs en los productos (incluidos los destinados a piensos) que sean, contengan, o estén producidos a partir de OGMs, responsabilizando a cada operador económico de proveer, junto con el producto, un informe de trazabilidad de modo que los consumidores puedan conocer el origen de cada una de las materias primas del producto. Los únicos exentos de etiquetar son quienes puedan demostrar que la presencia del OGM en su producto es accidental y técnicamente inevitable y está por debajo del umbral establecido de 0.9% (Reglamento 2003/1830/CE).

Desde el 2002, la evaluación científica de los OGMs corresponde a la EFSA (*European Food Safety Authority*) y sus decisiones son de plena aplicación en todos los estados miembros de la UE. Aunque en circunstancias debidamente justificadas, los países pueden prohibir eventos autorizados invocando la cláusula de salvaguarda (Art. 23 Dir. 2001/18/EC) donde prohíben de forma temporal el uso y/o la venta del producto GM en su territorio. Actualmente, seis países miembro están aplicando esta cláusula salvaguarda en eventos transgénicos: Francia, Grecia, Austria, Hungría, Alemania y Luxemburgo.

Mientras que la Unión Europea ha adoptado una aproximación estricta en la regulación de los alimentos biotecnológicos, EEUU ha decidido que estos productos no son diferentes de aquellos elaborados por métodos tradicionales (Prakash & Kollman, 2003). Debido a que nunca se ha asociado el consumo de estos OGMs con problemas de salud (*Food and Drug Administration* en su página web disponible en <http://www.fda.gov/Food/FoodScience-Research/Biotechnology.htm>) y considerando que las evaluaciones sanitarias, (en cuanto a protección de la salud se refiere) que tienen que superar los OGMs son mucho más rigurosas que las que debe cumplir cualquier otro alimento; la política de la FDA ha sido de no exigir el etiquetado de estos productos, por considerar que son “sustancialmente equivalentes” a los convencionales. Sin embargo, esta postura no representa a todos los americanos; según una encuesta realizada por el *New York Times* y publicada en Julio 2013, el 93% de los estadounidenses está a favor del etiquetado de alimentos GM (http://www.nytimes.com/2013/07/28/science/strong-support-for-labeling-modified-foods.html?_r=0). Múltiples organizaciones de consumidores y compañías de alimentos orgánicos han aunado esfuerzos y sus pedidos comienzan a ser considerados por las autoridades. En la página de la FDA actualmente se lee: “la FDA ha recibido peticiones ciudadanas en lo que concierne a los alimentos genéticamente modificados, incluyendo el etiquetado de dichos alimentos...la agencia esta actualmente considerando estos pedidos...” El 23 de Mayo del 2013 el senado de los EEUU voto en contra (23 votos contra 71) de la enmienda al proyecto de ley de agricultura (*Sanders amendment to the Farm Bill*). Si bien este proyecto de ley fracasó, la mitad de los estados han introducido leyes de etiquetado GM. (<http://www.centerforfoodsafety.org/issues/976/ge-food-labeling/state-labeling-initiatives>)

En los últimos años, cada vez más países han adoptado políticas de etiquetado para los alimentos genéticamente modificados (Dong *et al.*, 2008; Nikolic *et al.*, 2009). Actualmente

64 países tienen etiquetado obligatorio (ver tabla 3 y figura 2 en Apéndice). Sin embargo, se mantienen las intensas controversias sobre como etiquetarlos (Klintman, 2002). Las políticas de etiquetado difieren ampliamente en su naturaleza, alcance, excepciones y el grado en que se implementan y respetan (Gruere & Rao, 2007). Por ejemplo, en cuanto al alcance, las normativas de los distintos países pueden requerir o no el etiquetado de productos destinados a piensos, aditivos, carne y productos provenientes de animales alimentados con alimentos GM, productos comercializados en restaurantes y sin envoltorio. Algunas normativas solo requieren etiquetado para los productos que contienen una lista particular de ingredientes, otras para todos los ingredientes que contengan material transgénico detectable. El umbral por encima del cual los productos están sujetos a etiquetado también varía entre la reglamentación de los distintos países (Gruere & Rao, 2007). En la UE y Rusia se debe etiquetar un producto como GM cuando su contenido en transgénicos supere el 0.9%. En Australia, Nueva Zelanda, Arabia Saudita, Brasil y Venezuela este el valor umbral es del 1%, en Indonesia, Japón, Taiwan y Tailandia es del 5%, en Corea del Sur del 3%, mientras que China no definió un valor umbral. Estos valores límite en algunos países se aplican al contenido de cada ingrediente; en otros, al contenido de los tres o cinco ingredientes principales del producto.

Una de las diferencias principales entre las regulaciones de los distintos países con etiquetado obligatorio es si la presencia de transgénicos se considera en el productos final (como en Australia, Nueva Zelanda y Japón) o en la tecnología genéticamente modificada como un proceso de producción en la UE, Brasil y China entre otros (Gruere & Rao, 2007). Esto es importante porque en el primer caso solo productos con contenido detectable y cuantificable de transgénicos deben llevar etiqueta, mientras que si el etiquetado se aplica al proceso de producción, cualquier producto derivado de cultivos GM deberá estar etiquetado independientemente de si contienen trazas de material GM o no.

Algunos países, entre ellos EEUU, Canadá, Hong Kong y hasta hace poco Uruguay, tienen normativas que “promueven” el etiquetado voluntario, aunque son pocos los comerciantes de estos países que proactivamente eligen etiquetar sus productos como GM. En cambio sí se invierte en la certificación de los productos No GM, y de los productos orgánicos. Hasta fines del 2013, este también era el caso de Uruguay, en donde regía el decreto N°353/008 que establece que “el GNBio deberá promover

acciones tendientes a la implementación del etiquetado voluntario de aquellos alimentos en los que se pueda comprobar mediante análisis del producto final la presencia de ADN o proteínas genéticamente modificadas”. Sin embargo la sociedad civil uruguaya preocupada por el tema, elaboró una nueva reglamentación de etiquetado que fue aprobada por las autoridades de la Junta Departamental de Montevideo y actualmente se encuentra en proceso de reglamentación. En el Artículo D.1774.83 se establece que “los alimentos que han sido manipulados genéticamente o que contienen uno o más ingredientes provenientes de éstos que superen el 1% del total de componentes, deberán ser etiquetados especialmente conforme lo dispuesto en las presentes normas”; y en el Artículo D.1774.84 se establece que los productos mencionados en el artículo anterior deberán estar rotulados con la frase: “Este producto contiene organismos modificados genéticamente”.

5.3 METODOLOGIAS DISPONIBLES PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS:

Para poder implementar el etiquetado de alimentos se necesita de técnicas rápidas y confiables que permitan detectar aquellos productos que han sido adulterados. Estas metodologías han de ser específicas, sensibles, rápidas, económicas y capaces de proveer resultados cuantitativos (Meza-Marquez, Gallardo & Osorio, 2010). Muchos de los métodos que cumplen con estos requisitos aprovechan las diferencias bioquímicas entre los individuos. La secuencia de ADN de cada organismo es única, aunque algunas regiones se conservan dentro de la especie y otras entre grupos filogenéticamente relacionados. Esto permite que se puedan identificar y discriminar especies e incluso organismos individuales. Además, el ADN se transcribe en mRNA, que se traduce en proteínas. Esta expresión es diferencial y permite que el genotipo se manifieste a nivel fenotípico. Si bien las metodologías que se utilizan actualmente en la determinación de especies y de transgénicos se basan principalmente en el análisis de ADN y péptidos o proteínas (Ballin, Vogensen & Karlsson, 2009); también se han desarrollado técnicas que permiten el análisis de lípidos. Por ejemplo, la determinación de los ácidos grasos en posición 2 de triglicéridos luego de la hidrólisis enzimática y el análisis del perfil de ácidos grasos por cromatografía capilar de gases. Sin embargo, la interpretación de los datos en mezclas y productos procesados es casi imposible (Luthy, 1999).

Por otra parte, existe una gran diversidad de métodos para analizar proteínas. Los métodos cromatográficos, que incluyen la cromatografía de gases, de líquidos y la HPLC

(Cromatografía líquida de alta eficacia), son capaces de diferenciar entre muchas especies individuales. Sin embargo son menos eficientes en detectar especies particulares en mezclas complejas o alimentos procesados debido a que los cromatogramas se vuelven muy difíciles de interpretar. Además, se necesitan instrumentos costosos y procedimientos de preparación de muestras laboriosos lo que restringe su uso para propósitos de reglamentación (Hsieh, Woodward & Ho, 1995). Al igual que los métodos cromatográficos, las técnicas electroforéticas han probado ser muy útiles en la identificación de componentes alimenticios. Sin embargo, estos métodos no son convenientes para análisis de rutina debido a que son complejos de realizar, relativamente costosos y consumen una gran cantidad de tiempo (Dean, Murphy & Downey, 2006).

Muchas otras técnicas analíticas han demostrado ser capaces de identificar los componentes de diversas matrices alimentarias; entre ellas la espectrometría de masas, la resonancia de spin electrónico, la microscopía y la espectroscopía en el infrarrojo cercano (Edelmann *et al.*, 2001). Sin embargo, en los últimos años los métodos más utilizados en la identificación de carnes y productos cárnicos así como productos ictícolas, lácteos y muchos otros alimentos han sido los métodos genéticos y los inmunológicos (Dean, Murphy & Downey, 2006). De entre estos últimos, la técnica de ELISA es la más usada.

Los ensayos por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) son simples, versátiles, específicos y extremadamente sensibles (Macedo-Silva *et al.*, 2000). Si el resultado se compara con la señal emitida por concentraciones conocidas de la misma proteína, el ensayo se vuelve cuantitativo. Además existen tiras comerciales para la determinación de especies que pueden ser aplicados *in situ* y sus resultados se pueden obtener en 15 minutos (Muldoon *et al.*, 2004). Sin embargo, como todos los ensayos basados en proteínas no son adecuados para alimentos procesados debido a la pérdida de epítopes durante el procesamiento y a la desnaturalización durante la cocción. Así, se prefiere el ADN tanto para productos crudos como procesados (Elenis *et al.*, 2008).

Si bien las técnicas basadas en la detección del ADN son más sensibles a la contaminación y en algunas ocasiones más caras que las basadas en la detección de

proteínas, también son muy robustas y confiables. En comparación con el ARN o las proteínas, el ADN es una molécula mucho más estable y resistente a factores como las altas temperaturas, la presión y muchos compuestos químicos (Spychaj, Mozdziak & Pospiech, 2009) por lo que a menudo resulta más fácil obtenerlo en cantidad y calidad suficientes para su posterior análisis. El ADN está presente en la mayoría de las células y permite obtener la misma información a partir de cualquier tejido del animal (Ballin, Vogensen & Karlsson, 2009); mientras que la concentración de un determinado ARN o proteína varía de un tejido a otro del organismo. Además, el ADN es una fuente de información más rica que los ARNs y proteínas ya que también permite el análisis de las variaciones que surgen de la degeneración del código genético y de la presencia de regiones no codificantes. (Lockley & Bardsley; 2000).

Numerosas técnicas basadas en el análisis del ADN han sido adoptadas para satisfacer las necesidades de la industria alimentaria pero la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) merece especial atención por su rapidez, su alta sensibilidad y especificidad (Spychaj, Mozdziak & Pospiech, 2009). En la PCR se diseñan cebadores o *primers* que hibridan en hebras opuestas del ADN flanqueando la secuencia de interés. En ciclos consecutivos se amplifica de forma exponencial la secuencia entre los cebadores de modo que en pocas horas se obtienen millones de copias de la secuencia blanco. La confirmación de la identidad de un cierto producto de PCR o amplicón es un paso necesario en el análisis de PCR para asegurar que el ADN amplificado efectivamente corresponde a la secuencia blanco elegida y no es un producto de hibridación inespecífica de los *primers*. La aproximación más simple es analizar por electroforesis en gel si los amplicones tienen el tamaño esperado. Sin embargo, siempre está el riesgo de que un producto inespecífico del mismo tamaño que el blanco haya sido amplificado (Anklam *et al.*, 2001). Otros métodos confiables pero que consumen más recursos son el análisis por *Southern blot*, la PCR anidada que utiliza un segundo par de cebadores internos al amplicón y el corte del producto de PCR con enzimas de restricción (RFLP). Más información de los amplicones se puede obtener del análisis del Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple (SSCP) aunque la identificación por secuenciación es el método más directo y válido para analizar los amplicones de PCR (Ballin, Vogensen & Karlsson, 2009). En aquellos casos donde se desconoce la secuencia pero se cuenta con material de referencia resulta muy útil recurrir a técnicas como la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). En RAPD se utilizan cebadores cortos de secuencia

arbitraria para generar amplicones de distintos tamaños. Tanto para la muestra como para el material de referencia se obtienen perfiles de ADN con un número discreto de bandas, lo que hace posible la interpretación de resultados por simple inspección visual (Saez, Sanz & Toldra, 2004).

La PCR en tiempo real también llamada PCR cuantitativa o qPCR, permite realizar medidas cuantitativas de la cantidad de Ácido Desoxirribonucleico. A diferencia de la PCR convencional, donde se analizan los resultados al final del último ciclo, la PCR cuantitativa sigue la reacción mientras ocurre. La intensidad de las señales derivadas de sondas fluorescentes permite monitorear la cantidad de producto creado en cada ciclo de la PCR y en la fase exponencial temprana de la reacción los resultados permiten calcular la cantidad de ADN inicial. Además con este método es posible discriminar reacciones individuales de PCR dentro de experimentos duplex o multiplex si se asocia a cada *target* de ADN un fluorocromo diferente. Estas propiedades hacen que la cuantificación en tiempo real sea preferible al análisis convencional a tiempo final, que es un ensayo cualitativo (Ballin, Vogensen & Karlsson, 2009).

5.3.1 Identificación de especies:

Los alimentos son generalmente de origen animal o vegetal, por lo que la identificación confiable de las especies que contiene un alimento es vital para asegurar su autenticidad (Luthy, 1999). En cuanto a la identificación de especies en productos cárnicos, Ilhak & Arslan (2009) reportaron métodos para carnes crudas que incluyen: el análisis sensorial, la diferenciación histológica del pelo que pueda quedar en la carne, la electroforesis y la difusión del suero inmune en agar; así como las propiedades del tejido adiposo, el nivel de glucógeno en el músculo y las diferencias anatómicas entre otros. Sin embargo estos métodos tienen algunos problemas que limitan su uso; algunos son inespecíficos, caros, complejos o difíciles de realizar, otros consumen mucho tiempo, resultan inadecuados para discriminar entre especies emparentadas o no pueden realizarse de rutina (Haider, Nabulsi & Al-Safadi, 2012).

Es así, que las metodologías mencionadas para el análisis bioquímico de alimentos han ido ganando terreno en esta área. Por ejemplo, los métodos de cromatografía líquida que analizan el perfil proteico han podido detectar de forma cualitativa una variedad de

especies animales incluidos cerdo, cordero, pavo, pollo y vaca (Chou *et al.*, 2007). El isoelectroenfoque y la electroforesis capilar con SDS también han podido diferenciar entre mezclas de pavo, cerdo y vaca (Ballin, 2010). Por ELISA se han identificado pollo, vaca, caballo y cerdo en hamburguesas comerciales congeladas de carne de cerdo, pollo y vaca (Macedo-Silva *et al.*, 2001). La espectroscopía infrarroja ha permitido detectar y cuantificar la adulteración de carne picada con tejido graso, carne de otras especies e incluso con pasta de soja (Meza-Marquez, Gallardo & Osorio, 2010).

En vista del gran potencial que tiene la proteína de soja como adulterante de alimentos, varios grupos de investigación han desarrollado inmunoensayos que permiten identificarla y cuantificarla en productos cárnicos (Macedo-Silva *et al.*, 2001). La proteína de soja ha sido detectada por métodos como ELISA (Gonzalez-Cordova *et al.*, 1998; Koppelman *et al.*, 2004), y HPLC incluso en carnes altamente procesadas (Castro *et al.*, 2007). También existen varios inmunoensayos comerciales como el “*BioKits Soya Protein Assay*” y el “*Alert for Soy Flour Allergen*”.

Los estudios iniciales con ADN usaban métodos relativamente simples como el *Southern blot*. Con esta técnica se han logrado analizar productos cárnicos crudos y procesados identificando especies como pollo, caballo, cordero y carne. Si bien este método es menos sensible que la PCR ya que usa una sonda en vez de dos y no se lleva a cabo ninguna amplificación (Ahmed, 2002), la técnica también es menos sensible a la contaminación cruzada (Ballin, Vogensen & Karlsson, 2009). Actualmente, la técnica de PCR que utiliza *primers* especie- específicos es uno de los métodos por excelencia que permite la identificación de diferentes especies de carne. Asumiendo que el gen elegido esta en todas las especies pero al menos parte de su secuencia es específica de cada una, la PCR permite distinguir incluso carnes derivadas de animales emparentados por ejemplo pavo y pollo (Spychaj, Mozdziak & Pospiech, 2009). Otra ventaja del uso de cebadores especie-específicos en PCR es que permite la identificación simultánea de varias especies. Por ejemplo, el método de Matsunaga (Matsunaga *et al.*; 1999) permite identificar de forma simple y rápida la presencia de seis especies tanto en carnes crudas como cocidas a temperaturas de 100°C y 120°C por 30 minutos. En este método se utilizan proporciones adecuadas de siete *primers* un cebador directo diseñado para hibridar con una secuencia conservada del gen *cyt b* mitocondrial y seis cebadores reversos, cada uno específico de las seis especies a identificar: pollo, oveja, vaca, cabra,

caballo y cerdo. Estos *primers* están diseñados para generar amplicones de distintos tamaños de modo que las especies se puedan identificar de forma simultánea. Otros investigadores han desarrollado métodos que no dependen de *primers* especie-específicos sino de alguna otra técnica de discriminación secundaria. Tal es el caso de la PCR-RAPD que permitió la identificación simultánea de cinco especies animales (pavo, pollo, cerdo, vaca y oveja) en productos cárnicos como hamburguesas y panchos (Saez, Sanz & Toldra, 2004). Utilizando PCR-SSCP sobre el gen *citocromo b* Rehbein y colaboradores (Rehbein *et al.*, 1999) pudieron identificar siete especies de pescado en productos sometidos a tratamientos térmicos. El método de Bravi es un método rápido y simple de discriminar entre las especies de caballo, oveja, burro, perro, gato, conejo, cerdo, vaca, pollo y humanos (Bravi *et al.*, 2004). Se basa en el uso de cebadores universales diseñados para amplificar un fragmento conservado de 358 pb del gen *citocromo b*. El amplicón se corta con tres enzimas de restricción (*AluI*, *HaeIII* e *HinfI*) y los fragmentos resultantes se resuelven en un gel de poliacrilamida. Dado que parte de la secuencia del gen varía en las distintas especies, la combinación de las tres enzimas permite obtener un patrón único de corte para cada especie.

Si bien estas técnicas moleculares pueden tener como blanco tanto genes nucleares como mitocondriales, para estudios de especiación, el ADN mitocondrial posee varias ventajas. Su alta tasa de variación mutacional ha llevado a la acumulación de suficientes mutaciones puntuales que actualmente permiten distinguir entre especies con alto grado de homología. Además dentro de los organelos, el ADN está protegido del medio externo por lo que la calidad del ADN mitocondrial que puede obtenerse es mejor que la del ADN nuclear. Asimismo, el ADN mitocondrial es de herencia materna de modo que los individuos normalmente poseen solo un alelo y se evitan las ambigüedades de secuencia que surgen de genotipos heterocigotas. Finalmente, dado que las células contienen cientos de copias de ADN mitocondrial y cloroplástico, su uso para métodos de PCR asegura un límite de detección mucho menor comparado al ADN genómico de copia única (Ballin, Vogensen & Karlsson, 2009).

De entre los genes mitocondriales, para la identificación de especies animales se han usado el gen del *citocromo b*, el *D-loop*, el gen *12S rARN* y el *16S rARN* (Spychaj, Mozdziak, & Pospiech., 2009; Girish *et al.*, 2005). Por ejemplo, el ADN mitocondrial del gen que codifica para el ARN ribosomal 12S ha permitido la identificación inequívoca de

carnes de ciervo común, corzo y gamo (Fajardo *et al.*; 2007). Sin embargo, el gen más utilizado para la identificación de especies animales ha sido el que codifica para la subunidad catalítica de la enzima Citocromo b oxidasa (COI) (Hebert *et al.*, 2002). De hecho Hebert, Cywinska, Ball, & deWaard (2003) han propuesto que la diversidad de secuencia en este gen podría ser usada para crear un sistema de “barcoding” que permita la identificación de toda vida animal (Haider, Nabulsi & Al-Safadi., 2012) (www.barcoding.com). En el caso de plantas también se han propuesto varios marcadores como ser las secuencias de ADN cloroplástico *rbcL* y *trnH-psbA* y la secuencia de ADN nuclear *matK* (Taberlet, Gielly & Bouvet, 1992; Chase *et al.*, 2007).

5.3.2 Detección e indentificación de OGMs:

La aplicación de la biotecnología vegetal implica la necesidad de vigilar y verificar la presencia y la cantidad de OGMs en cultivos y en alimentos derivados (Anklam *et al.*, 2002). Los cultivos GM por lo general contienen genes que codifican para una proteína adicional que confiere la característica de interés (Ahmed, 2002; Lipp *et al.*, 2001); por lo que los transgénicos o sus derivados pueden ser identificados detectando el fenotipo, el gen insertado, el mRNA transcrito o la proteína codificada (Van den Eede *et al.*, 2000).

La resistencia a herbicidas puede ser evaluada mediante ensayos sencillos en laboratorio y en campo (Tozzini *et al.*, 2000). Más comunes son los métodos basados en la detección de las proteínas codificadas por los transgenes, que incluyen: las tiras de flujo lateral (*Lateral Flow Strips*), *Western Blot* y *ELISA*. Todos estos inmunoensayos se basan en la unión Antígeno-Anticuerpo y por tanto son altamente específicos aunque dependen de la disponibilidad de la nueva proteína y de anticuerpos que la reconozcan (Ahmed, 2002). Además, si bien estos métodos inmunológicos resultan rentables y fáciles de realizar (Brett *et. al.*, 1999; Stave, 2002; Van de Bulcke *et al.*, 2007); tanto su efectividad como su precisión pueden verse comprometidas en matrices complejas debido a interacciones inespecíficas del anticuerpo con proteínas, surfactantes y compuestos fenólicos (Anklam *at. al.*, 2002). Su baja sensibilidad es otro obstáculo para su aplicación, ya que algunos OGMs no expresan el transgen en niveles detectables (Luthy, 1999).

A pesar de que en la actualidad se están desarrollando nuevas técnicas de análisis de OGMs, como espectrometría de masa, cromatografía, espectroscopia en el IR cercano y

chips de ADN, entre otros; las metodologías clásicas son las generalmente aceptadas y validadas para propósitos regulatorios (Anklam *et al.*, 2002). Los métodos de detección basados en el análisis del ADN han probado ser más sensibles que los de proteína, (Matsuoka *et al.*, 2000; Van de Bulcke *et al.*, 2007), sobre todo al trabajar con alimentos procesados (Popping, 2001). De los numerosos métodos que permiten el análisis del ADN, la PCR es la más popular para el análisis de OGMs tanto por su versatilidad, que va del *screening* a la identificación de eventos, como por su alta especificidad y eficiencia. Por este motivo se han desarrollado métodos de detección por PCR para la gran mayoría de los OGMs. (Dong *et al.*, 2008- GMDD Database).

La detección e identificación de alimentos derivados de OGMs se basa en la detección de las construcciones génicas. En el caso más simple, el ADN foráneo comprende un promotor de transcripción, una secuencia codificante y un terminador de transcripción (Elenis *et al.*, 2008). Cualquiera de estos elementos o incluso las uniones entre ellos pueden ser detectados por PCR. Sin embargo, en la elección de la secuencia blanco se debe considerar que muchos de estos elementos pueden originarse de forma natural en los organismos. También pueden estar presentes en más de un OGM y su número de copias puede variar de un organismo transgénico a otro; incluso pueden estar combinados de forma similar en más de un evento. Así el método elegido debe adecuarse al propósito del análisis (Holst-Jensen *et al.*, 2003). El par de *primers* seleccionados determinan la región blanco que se amplificará y por lo tanto la especificidad del ensayo y la información que se pueda obtener del mismo. Es así que los métodos de detección de transgénesis por PCR se pueden clasificar en cuatro niveles de especificidad (Shrestha *et al.*, 2010) (ver Apéndice Figura 1).

5.3.2.1 Métodos de Rastreo:

Los métodos de Rastreo o *Screening* permiten analizar de forma rápida si una muestra contiene o no rastros de material transgénico (Grohmann *et al.*; 2009). Se amplifican secuencias que son comunes a ciertos grupos de transgénicos. La mayoría de las plantas GM en el mercado comparten algunos de los elementos reguladores que forman parte de su construcción. Por ejemplo, el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (*p35S*) presente en al menos 43 eventos, y el terminador de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (*T-nos*), presente en 37 eventos (Bruderer & Keitner, 2003); así como genes de resistencia a antibióticos, principalmente ampicilina (gen *bla*) y neomicina/kanamicina

(gen *nptII*) (Aarts, Rie, & Kok, 2002).

La elección de los *primers* debe permitir la detección de la mayor cantidad de variantes posibles; aunque no existe un solo rastreo que detecte todos los OGMs. A medida que aumenta el número de eventos transgénicos en el mercado, surgen nuevos elementos de control y secuencias codificantes. Ya se han reportado numerosos eventos GM aprobados que no contienen los elementos comunes *p-35S* o el terminador *nos*. Por este motivo, se requieren nuevas tecnologías de detección con alto rendimiento y bajo costo que sean capaces de analizar la presencia de numerosos eventos. En este sentido los sistemas miniaturizados como los *microarrays* parecen ser muy prometedores. (Anklam *et al.*, 2002).

En la aproximación clásica, luego de la PCR se realizan geles de poliacrilamida para analizar los tamaños de los amplicones. Este método cualitativo no es automatizable y no provee confirmación de secuencia. (Elenis *et al.*, 2008)

5.3.2.2 Métodos específicos de gen:

Tienen como blanco de amplificación el o los genes que confieren la característica de interés. Por ejemplo genes de tolerancia a herbicidas como el gen *CP4 EPSPS* derivado de la cepa *CP4* de *Agrobacterium tumefaciens* que codifica para la 5-enol-piruvil-shiquimato-3 fosfato sintasa; o los genes *pat/bar* derivados de *Streptomyces spp.*, que codifican para la toxina *CryIA(b)* de *Bacillus thuringiensis* (Grohmann *et al.*; 2009).

Estos métodos son más específicos que los anteriores porque la variedad de genes disponibles es mucho mayor que la de elementos regulatorios. Una señal negativa en esta categoría de ensayos normalmente no descarta la presencia de transgénicos en la matriz; mientras que una señal positiva no sólo implica que la muestra contiene OGMs; sino que en ocasiones permite identificarlos. Esta identificación será certera siempre que el gen en cuestión haya sido incorporado en un solo evento. Por el contrario, cuando el gen ha sido utilizado para generar diferentes líneas GM, el riesgo de obtener falsos positivos es significativamente más alto (Yang *et al.*, 2007; Chaouachi *et al.*, 2008). Por ejemplo el gen *CryIA(b)* puede derivar de los eventos Bt176, Bt11 o MON810. También se pueden obtener falsos positivos cuando el gen es de origen natural, aunque por lo general el transgen estará ligeramente modificado con el uso de codones alterado o el gen truncado.

5.3.2.3 Métodos específicos de construcción:

En estos métodos se amplifican las uniones entre elementos adyacentes de una construcción génica, por ejemplo entre el promotor y el gen e interés (Holst-Jensen *et al.*, 2003). Además de permitir confirmar la presencia de material transgénico, los métodos específicos de construcción permiten en muchos casos identificar el evento, y el riesgo de reportar falsos positivos es significativamente menor que en los métodos anteriores. Sin embargo, algunas de las variantes transgénicas comercializadas comparten la misma construcción que se integra en diferentes regiones cromosómicas y en un número variable de copias (Rønning. SB, *at. al.*; 2003). Por ejemplo los plásmidos pV-ZMBK07 y pVZMGT10 fueron transformados en varias variedades de maíz. Mon809 contiene una copia de cada uno, Mon 810 una copia del primero, Mon 832 una copia del segundo y Mon80100 un número no conocido de copias (Holst-Jensen *et al.*, 2003).

5.3.2.4 Métodos específicos de evento:

Cada evento es una recombinación o inserción particular de ADN que ocurre en la célula vegetal a partir de la que se origina la planta transgénica. Así, cada Organismo Genéticamente Modificado queda definido por un único evento de transformación (Holst-Jensen *et al.*, 2003). Para la identificación inequívoca de eventos, la selección de cebadores tiene que estar basada en secuencias blanco que sean características de las regiones de integración. Con las técnicas de transformación actuales es muy poco probable que una construcción se integre dos veces en el mismo locus genómico de la planta. Como consecuencia, las uniones entre el ADN integrado y el ADN del huésped son únicas para cada evento y los sistemas de PCR que tengan como blanco este borde de integración serán evento-específicos (Rønning *et al.*; 2003).

Desafortunadamente, incluso estos métodos tienen sus limitaciones. Además de ser los más costosos, no son lo suficientemente buenos al caracterizar muestras de cultivos mixtos y plantas transgénicas con genes apilados (Akiyama *et al.*, 2005; Demeke & Ratnayaka, 2008). Cuando dos líneas GM se cruzan su descendencia híbrida puede contener las modificaciones genéticas de los dos eventos que serán indistinguibles de las líneas parentales; este fenómeno se conoce como apilamiento de genes. (Holst-Jensen *et al.*, 2003). Cada par de cebadores pueden detectar un evento o grupo de eventos en un cultivo en particular, pero ninguno puede detectar en un único ensayo todos los eventos, por eso no se puede asegurar que una muestra está libre de OGMs, sólo se puede

asegurar que está libre de los eventos para los cuales se hayan realizado los análisis pertinentes (Tozzini *et al.*, 2000). La tendencia actual es hacia el desarrollo de ensayos multiplex con amplificación simultánea de varias secuencias evento específicas y el reemplazo de la electroforesis en geles de poliacrilamida por electroforesis capilar (Elenis *et al.*, 2008)

En el proceso de detección de OGMs se pueden diferenciar tres etapas. La detección cualitativa o *Screening* de OGMs, cuyo objetivo es establecer la presencia o ausencia de organismos transgénicos en una muestra; la identificación de el o los eventos específicos que contiene dicha muestra y la cuantificación de uno o más de los OGMs presentes en un producto (Mazzara, *et al.*, 2013). Conocer el contenido porcentual de OGM en la muestra es un aspecto crucial en el análisis de transgénicos ya que los límites máximos de OGMs en los alimentos son la base del etiquetado en la mayoría de los países que lo implementan. Con fines cuantitativos, a principio de la década de los 90 se desarrolló la PCR competitiva. Actualmente, el método más utilizado es la PCR en tiempo real. Está disponible en varios sistemas, todos ofrecen cuantificación en tiempo real midiendo las señales de fluorescencia emitidas por una o dos sondas específicas de hibridación o de un colorante que se intercala en el ADN como SYBR Green (Windels *et al.*, 2001).

5.3.3 Soja *Roundup Ready* y su detección:

Soja *RR* (*Roundup Ready*) es el nombre comercial del evento GTS 40-3-2 desarrollado por la compañía Monsanto. Se caracteriza por su tolerancia al glifosato principio activo del herbicida Roundup, usado para el control de malezas. Esta línea de soja contiene en su genoma una forma modificada del gen que codifica la enzima vegetal 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) extraída de la cepa CP4 de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*. Esta versión modificada de la enzima participa en la ruta del shiquimato permitiendo la síntesis de aminoácidos aromáticos aún en presencia de glifosato. La expresión de este gen, introducido en copia única, está regulada por el promotor potenciado *p*-35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y por el elemento de terminación de la transcripción del gen de la nopalina sintasa (*nos*) de *Agrobacterium tumefaciens*. Además también contiene una secuencia que codifica el péptido señal de transporte al cloroplasto CTP4 proveniente de *Petunia hybrida*. Este elemento facilita la translocación de la EPSPS sintasa al interior de los cloroplastos, donde se sintetizan los aminoácidos aromáticos y donde actúa el glifosato.

Con la colaboración de cientos de laboratorios se han desarrollado y validado numerosos ensayos y kits para detectar y cuantificar los elementos, construcciones y eventos transgénicos. El Compendio de Métodos de Referencia para el Análisis de OGMs (*JRC Reference Report*) del *European Union Reference laboratory for GM food and feed* contiene los métodos que han sido adoptados por la Unión Europea. La Base de Datos de Métodos de Detección de OGMs (GMDD) contiene todos aquellos métodos que han sido publicados (Dong *et al.*, 2008). Para la detección del evento GTS 40-3-2 hay numerosos métodos tanto basados en la detección de proteínas como de ADN (ver Apéndice Figuras 3 y 4).

OBJETIVOS:

6.1 Objetivo General

00El objetivo de esta tesis de grado es analizar, en cuanto a su composición en especies animales y vegetales (incluyendo transgenicidad), algunos alimentos de consumo masivo principalmente hamburguesas de carne y alimentos con pasta de soja declarada o no en la respectiva etiqueta (hamburguesas, milanesas, pancho, tofu).

6.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos se plantean:

1. Optimizar métodos de extracción de ADN para las matrices alimentarias en estudio.
2. Recuperar ADN en cantidad y calidad suficientes para servir de molde eficaz en reacciones de PCR.
3. Analizar cualitativamente la composición de las matrices alimentarias elegidas en cuanto a la presencia de ciertas especies animales (vaca, pollo) y vegetales (soja).
4. Detectar, mediante PCR a tiempo final, la transgenicidad en esos ADN. Es decir la presencia/ ausencia de OGMs.
5. Evaluar la identidad de los eventos transgénicos (autorizados para su comercialización en Uruguay) en las muestras que resulten positivas en 4.
6. Dotar de herramientas analíticas a los organismos de contralor para que puedan implementarlas en sus análisis de rutina. En particular, contribuir con herramientas moleculares que les permitan detectar e identificar especies animales, vegetales y transgénicos en estas matrices en estudio.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

La estrategia experimental a ser usada se basa en la extracción del ADN de las muestras y su posterior análisis por métodos moleculares de amplificación por PCR que permitan detectar e identificar las especies animales, vegetales y transgénicas elegidas. En la figura 1 se puede observar un diagrama de flujo con la estrategia experimental a ser utilizada.

Las muestras serán homogeneizadas y se extraerá su ADN, optimizando el proceso de forma de obtener ADN en cantidad y calidad suficientes para su posterior amplificación por PCR.

Para detectar la presencia o ausencia de las especies animales vaca y pollo en las hamburguesas de carne, se utilizarán los métodos de Matsunaga (Matsunaga *et al.*, 1999) y Bravi (Bravi *et al.*, 2004). Ambas metodologías se basan en la amplificación del gen mitocondrial *cytb*. Para identificar la especie vegetal *Glycine max*, mejor conocida como soja, se utilizarán cebadores específicos que permiten amplificar una porción del gen de la lecitina de soja, característica de la especie. En caso de encontrar presencia de soja se realizarán ensayos de transgenicidad.

Todos los análisis de transgénicos estarán basados en los métodos establecidos en la base de datos GMDD y validados por la UE, contenidos en el JRC. En particular se utilizarán los métodos de *screening* que permitan detectar la presencia de los elementos comunes promotor 35S y el terminador *t-nos*. Las muestras que den positivas para estos ensayos serán analizadas para identificar el evento GTS 40-3-2.

Tanto en la detección de especies animales y vegetales como en los ensayos de transgenicidad, la estrategia experimental implicará la amplificación de secuencias específicas por PCR a tiempo final seguida de electroforesis en geles de poliacrilamida. Los perfiles obtenidos para las muestras amplificadas serán comparados con aquellos provenientes de los controles negativos y positivos. Además, en aquellos casos donde resulte necesario, se recurrirá a la secuenciación de los amplicones obtenidos para confirmar su identidad.

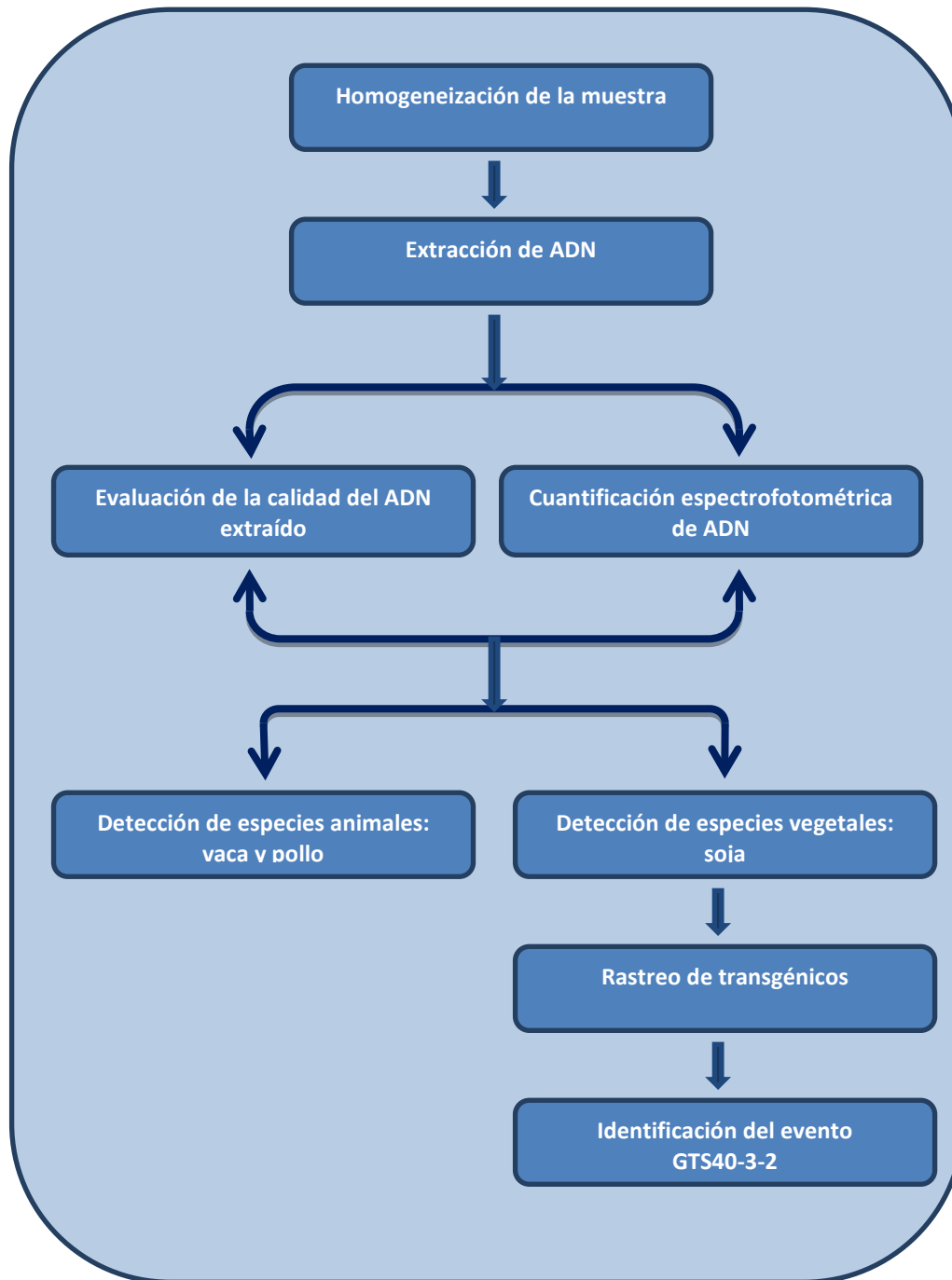


Figura 1: Diagrama de flujo de la estrategia experimental a ser utilizada

MATERIALES Y MÉTODOS:

8.1 Descontaminación:

Para evitar fuentes externas de contaminación se tomaron varias medidas preventivas, entre ellas el uso de guantes en todo momento y la utilización de distintos lugares de trabajo para realizar las extracciones, PCRs y electroforesis. Cada uno de estos sitios cuenta con su propio juego de micropipetas, tubos eppendorf y puntas de micropipeta. Además de estas medidas generales, en cada etapa se tomaron distintas precauciones que serán posteriormente descritas.

8.2 Muestras de partida:

En la realización de esta tesis se analizaron 21 muestras provenientes en su mayoría de mercados uruguayos. Como puede observarse en la tabla 1, se analizaron hamburguesas de carne así como varios productos basados en proteína de soja.

Muestra #	Tipo de producto	Origen	Especies animales declaradas	Especies vegetales declaradas
1	Hamburguesa de carne	Uruguay	vaca	proteína vegetal y especias
2	Hamburguesa de carne	Uruguay	vaca	ninguna
3	Milanesa de soja	Uruguay	ninguna	soja certificada no transgénica
4	Hamburguesa de carne	s/declaración ¹	s/declaración ¹	s/declaración ¹
5	Hamburguesa de carne	Uruguay	vaca	ninguna
6	Hamburguesa de carne	Uruguay	vaca	proteína de soja, pimienta
7	Hamburguesa de carne	Uruguay	vaca	proteína de soja, pimienta
8	Hamburguesa de carne	Uruguay	vaca	proteína de soja, pimienta, ajo
9	Milanesa de soja	Argentina	ninguna	soja, acelga, arroz, trigo, ajo, pimienta, etc
10	Hamburguesa de soja	Uruguay	ninguna	soja certificada no transgénica
11	Milanesa de soja	s/declaración ²	s/declaración ²	s/declaración ²
12	Tofu	s/declaración ²	s/declaración ²	s/declaración ²
13	Hamburguesa de carne	Uruguay	vaca	ninguna
14	Hamburguesa de carne	Uruguay	vaca	ninguna
15	Pancho de soja	Uruguay	ninguna	proteína de soja, gluten, almidón modificado
16	Hamburguesa de soja	s/declaración ³	s/declaración ³	s/declaración ³
17	Hamburguesa de carne	Uruguay	vaca	ninguna
18	Hamburguesa de soja	Uruguay	ninguna	Proteína de soja

Tabla 1: En rojo se encuentran resaltadas las hamburguesas de carne, todas ellas crudas. El resto de los colores son productos declarados de soja. En celeste se resaltan hamburguesas/milanesas de soja crudas congeladas, en verde productos cocidos o altamente procesados y en amarillo una muestra de pancho de soja. (1) Hamburguesa provista por una empresa manufacturera para una asesoría técnica. (2) Alimentos obtenidos por el tutor de esta tesis en un establecimiento gastronómico de comida china. (3) Muestra obtenida en la cantina de un servicio universitario.

Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio en hielo. Al momento de su arribo fueron debidamente identificadas con un código de trabajo interno y selladas para evitar su contaminación. Se las mantuvo a -20°C , como máximo durante una semana, hasta el momento de la extracción de ADN.

8.3 Extracción de ADN por Método Dellaporta modificado:

Para las extracciones de ADN, se utilizó un protocolo basado en el descrito por Dellaporta *et al.* (Dellaporta, 1983). Este protocolo fue modificado y puesto a punto en nuestro laboratorio, de forma que actualmente se utiliza para extraer ADN de una gran cantidad de matrices.

Procedimiento:

- 1) Previo a cada extracción, la mesada de trabajo al igual que los morteros y las navajas fueron descontaminadas con hipoclorito de sodio 10% por 5 minutos, Etanol 70% y agua destilada.
- 2) Las muestras fueron desempacadas y una porción de la muestra se cortó y colocó en un mortero de cerámica donde se disgregó y homogeneizó mecánicamente.
- 3) Se pesaron 250 mg de muestra y se colocaron en un tubo eppendorf de 2,2 mL
- 4) Se agregó 1mL de Buffer de extracción compuesto por: Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, SDS 1%, β -mercaptoetanol 10 mM (agregado justo antes de la extracción) y agua mQ en csp. Se mezcló por inversión durante 30 seg
- 5) Posteriormente se agregaron 10 μL de proteinasa K (10 mg/mL) y se colocaron las muestras en un baño de agua a 65°C durante 30 minutos, agitando cada 5-10 minutos.
- 6) Para la desproteinización de la muestra, a continuación se agregaron 500 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión unas 100 veces.
- 7) La posterior centrifugación a 12 Krpm durante 5 minutos permitió separar el ADN de las proteínas.
- 8) 1mL de fase acuosa fue transferido a otro tubo de 1,5 mL
- 9) A dicho tubo se le adicionaron 300 μL de Acetato de potasio 5M y se mezcló bien antes de incubar por 10 min en hielo
- 10) Luego se centrifugó nuevamente a 12 Krpm durante 20 minutos y el sobrenadante resultante fue transferido a otro tubo de 2,2 mL.

- 11) Se agregó un volumen igual de isopropanol y se mezcló por inversión unas 20 veces.
 - 12) La centrifugación a 12 krpm por 15 minutos, permitió precipitar el ADN.
 - 13) El sobrenadante se descartó y el *pellet* fue lavado con 400µL de EtOH (etanol) 70%.
 - 14) Se centrifugó a 12 Krpm durante 5 min para eliminar el EtOH.
 - 15) Luego de descartar el sobrenadante, los tubos abiertos fueron colocados durante 5 minutos en un desecador rotatorio en vacío (*Speed Vac SC100*) que permite secar los sedimentos de ADN.
 - 16) Finalmente el precipitado seco fue resuspendido en 100 µL de agua mQ.
 - 17) Los tubos se dejaron on (*overnight*- toda la noche) a 4°C
- Al día siguiente, los ADN se sometieron a choque térmico (68°C por 5 minutos) antes de analizar las muestras. Los ADN fueron luego mantenidos en freezer a -20 °C.

El protocolo recién descrito, en adelante llamado “Protocolo de extracción Dellaporta Modificado 1” fue a su vez modificado en un intento de optimización para las matrices en estudio de este trabajo. Así, el “Protocolo de extracción Dellaporta Modificado 2” tiene las siguientes modificaciones con respecto al 1:

- En el paso 2 el tejido se cortó en pedazos más pequeños para mejorar la disgregación, y durante la homogeneización se utilizó nitrógeno líquido para aumentar la disrupción mecánica.
- En el paso 5, las muestras se dejaron durante 90 minutos en el baño de agua con agitación cada 10 minutos.
- Se realizó una doble etapa de desproteinización, repitiendo los pasos 6, 7, y 8 antes de agregar el Acetato de Potasio.

8.4 Obtención de ADNs control:

Los controles de vaca y de soja *RR* fueron proporcionados por el tutor de esta tesis.

El control positivo de pollo, se obtuvo por extracción del ADN a partir de hígado de pollo.

8.4.1 Extracción de ADN a partir de hígado de pollo:

La muestra de hígado de pollo fue donada por un comercio local. Se realizaron por duplicado dos métodos de extracción: el protocolo de Dellaporta Modificado 1 ya descrito y el *Kit Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen) que se describe a continuación.

QIAGEN Dneasy Blood & Tissue Kit: Protocolo de Purificación de ADN total a partir de tejidos animales: Se cortaron 25 mg de tejido en trozos muy pequeños y se colocaron en un tubo de 1,5 mL. Se agregaron 180 µl del tampón de lisis proporcionado por el kit y se mezcló vigorosamente. A continuación se añadieron 20 µl de proteinasa K, se vortexó por 15 segundos y se incubó a 56°C hasta que el tejido estuvo completamente lisado. Debido a que las células provenientes de hígado son transcripcionalmente muy activas, el kit recomienda la incubación con ARNasa. A continuación se añadieron 200 µl del Buffer AL proporcionado por el kit y se mezcló por pipeteo suave, para homogeneizar. Inmediatamente se agregaron 200 µl EtOH (96–100%) y se volvió a homogeneizar. La mezcla anterior se pasó por una columna DNeasy Mini spin contenida en un tubo de 2.2 mL. Se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto y se reemplazó el tubo colector de 2.2 mL. Los contaminantes que pudieron haber quedado pegados a la columna fueron removidos mediante la adición de 500 µl del Buffer AW2 y centrifugación (3 minutos a 14000 rpm). El tubo colector se volvió a reemplazar y se eluyó el ADN de la columna con 100 µl del Buffer AE y centrifugación (1 minuto a 8000 rpm). Para aumentar el rendimiento se puede repetir este último paso de centrifugación.

8.5 Calidad y cantidad del ADN extraído:

El análisis de la calidad y cantidad del ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa y mediante análisis espectrofotométricos.

8.5.1 Análisis espectrofotométricos:

La concentración de los ADNs fue estimada por medio de espectrofotometría. Es bien sabido que los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción a 260nm, por lo que su concentración se puede calcular a partir de la ecuación: $C = \text{Abs}(260\text{nm}) / \epsilon b$, donde C es la concentración, Abs (260nm) es la absorbancia, b el ancho de la celda y ϵ el coeficiente de extinción que depende de la secuencia del ácido nucleico. Sin embargo, utilizando la regla empírica $1 \text{ DO} \approx 50 \mu\text{g/mL}$ se puede estimar la concentración de ADN. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop Thermo Scientific ACTGen 3700), en el que se coloca 1 µL de la muestra y el software calcula la concentración de la misma. Esta es una concentración sobreestimada porque las proteínas también absorben a 260 nm. Para estimar el grado de impurezas de origen proteico se calculó el cociente A_{260}/A_{280} , ya que a 280 los ácidos nucleicos casi no

absorben y los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas tienen un máximo de absorción.

8.5.2 Electroforesis en geles de agarosa:

La electroforesis en geles de agarosa es un método muy simple y efectivo que en este caso usamos para estimar la integridad del ADN extraído. Los geles de agarosa al 1% fueron preparados fundiendo 1g de agarosa en 100 mL de buffer TAE 1X (40mM Tris, 2M Ácido Acético, 50mM). Se dejó enfriar. A continuación se agregaron 10µL del compuesto Goodview, y se volcó en el molde. Se agregó el peine y se dejó gelificar. Una vez gelificado se colocó el gel en la cuba de electroforesis y se cargaron las muestras junto a un marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (Biolabs). Para preparar las muestras se utilizó buffer de carga 6X (0.03% del marcador de corrida azul de bromofenol; 0.03 xilene cyanol, 60% glicerol, 60 mM EDTA). La corrida electroforética fue realizada 1hr a 100V. El Goodview es un compuesto que se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos y fluoresce al ser expuestos a luz UV, por lo que la visualización de los ácidos nucleicos se realizó utilizando un transiluminador UV. El resultado se registró fotográficamente.

8.6 Amplificación por PCR a tiempo final:

En cada una de las PCRs realizadas en esta tesis los implementos, a excepción de los reactivos, fueron descontaminados en una cámara UV por 15 minutos. En esta misma cámara se realizó el *mix* de PCR con todos los reactivos a excepción del ADN. Este *mix*, que permite minimizar los errores de pipeteo, fue luego distribuido en los distintos tubos de PCR, previo a la adición del ADN en una zona separada.

8.6.1 Detección de especies animales:

Como se mencionó en la estrategia experimental para detectar la presencia o ausencia de *Bos taurus* (vaca) y *Gallus gallus* (pollo) en las distintas muestras se siguieron dos estrategias basadas en los trabajos realizados por Matsunaga *et al.* y Bravi *et al.*

Para ambas estrategias se siguió el siguiente procedimiento: las reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos tipo eppendorf de 200 µL (tubos de PCR) a los que se le agregaron 2,5 µL de Buffer 10X, 1,25 µL MgCl₂ 50 mM, 0,25 µL de dNTPs 25mM (desoxirribonucleótidos), 0,25 µL de la polimerasa Taq HybriPol, 1 µL de cada uno de los

dos cebadores específicos para el método (todos alicuotados a concentraciones 10 mM) y agua en csp 24 µL. Finalmente, en una zona separada, se agregó 1 µL de las diluciones 100ng/ µL de los ADN extraídos de las muestras.

El termociclador se programó para realizar un paso inicial de desnaturalización por 4 minutos a 94°C, seguido de 33 ciclos de amplificación cada uno con tres pasos. Un primer paso de desnaturalización de 20 segundos a 64°C, luego una etapa de 20 segundos a 62°C para permitir la hibridación de los *primers* y una fase de 20 segundos a 72°C para permitir la extensión por la polimerasa. Al finalizar los 33 ciclos una extensión final de 7 minutos a 72°C.

8.6.1.1 Método de Matsunaga:

En el método descrito por Matsunaga (Matsunaga *et al.*, 1999) se amplifica una porción del gen *cyt b* utilizando un cebador directo universal que hibrida con una secuencia bastante conservada presente en todas las especies; y cebadores reversos complementarios a secuencias especie específicas. Estos cebadores reversos tienen dos características importantes: a la temperatura de trabajo cada uno hibrida con el ADN de una única especie, porque tienen como blanco las secuencias de ADN poco conservadas en el gen. Además, los cebadores reversos están además diseñados para hibridar a distintas distancias del sitio donde hibrida el cebador directo. De este modo, distintas especies darán lugar a amplicones de distinta longitud y peso molecular que pueden ser distinguidos por electroforesis en gel. El método original permite identificar seis especies en simultáneo: vaca, pollo, cabra, cerdo, oveja, y caballo. En nuestras matrices problema solo buscaremos vaca y pollo. Además, en este caso no se realizará una multiplex sino que se analizará la presencia de una sola especie por reacción.

Para detectar la presencia de pollo se utilizaron los cebadores Fsim y Rc cuya secuencia se describe en la tabla 2 y el sitio en el que hibridan; así como el amplicón que generan se muestran en la figura 2. En presencia de esta especie se obtiene un amplicón de 224pb. En cada PCR se corrieron, en paralelo a las muestras, un control positivo y un control negativo. Como control positivo se utilizó el ADN extraído de hígado de pollo, en particular el que se obtuvo en mejor calidad. Para asegurar la ausencia de ADN contaminante y la especificidad de los *primers*, también se realizó un control negativo que contenía los mismos componentes que el resto de las reacciones a excepción del ADN.

Para detectar la presencia de vaca por este método se utilizó el mismo cebador directo universal, Fsim, y como *primer* reverso especie específico el Rk. En esta amplificación esperamos obtener un amplicón de 274 pb en todos aquellos casos en que este presente la especie. Las secuencias de los cebadores y los amplicones se observan en la tabla 2 y la figura 2. El control positivo de vaca fue proporcionado por el tutor de esta tesis; como control negativo se utilizaron todos los reactivos a excepción del ADN muestra.

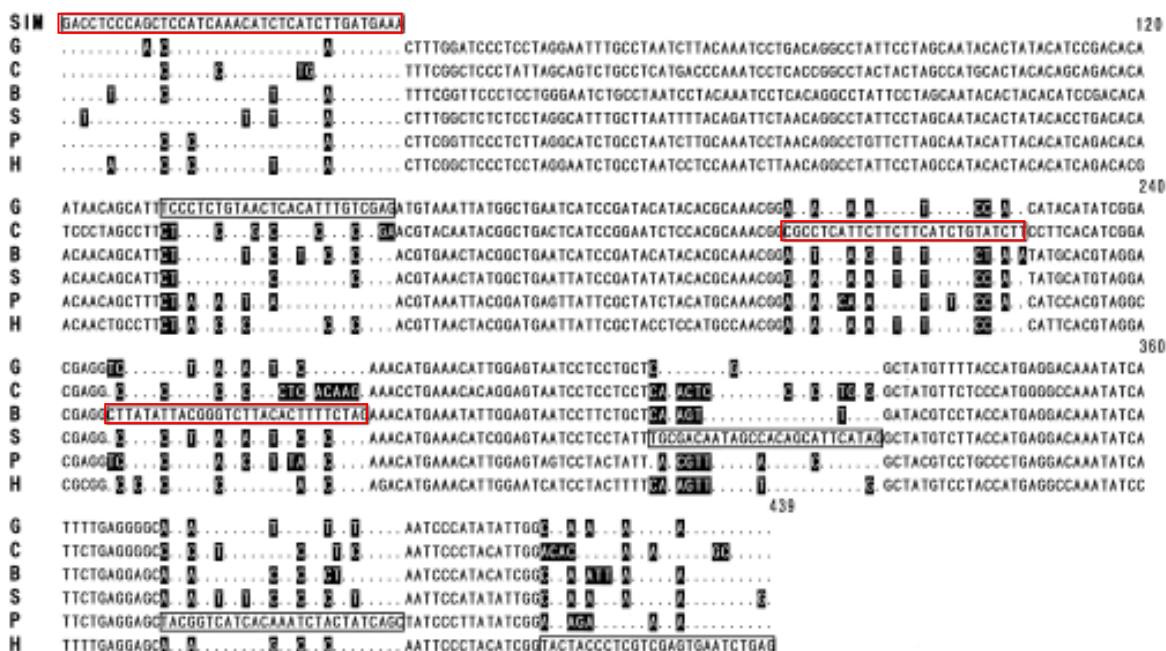


Figura 2. Secuencia nucleotídica de la región del gen *cyt b*, blanco de las amplificaciones de Matsunaga *et. al.*, (1999). Los cebadores utilizados se encuentran encuadrados en rojo y las bases desapareadas están resaltadas en negro. Se observa como los distintos cebadores reversos hibridan en distintas regiones del gen *cyt b* y por lo tanto en la amplificación por PCR dan lugar a amplicones con tamaños característicos. C (chicken) es la secuencia del gen *cyt b* de pollo y B (*Bos taurus*) la secuencia del gen de la vaca (Figura tomada de Matsunaga *et. al.*, 1999).

Primers utilizados en el Método de Matsunaga de detección de especies animales			
Método	Amplicón	Primers	Secuencia
Matsunaga vaca	274 pb	Fsim	5' GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA 3'
		RK	5' CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG 3'
Matsunaga pollo	224 pb	Fsim	5' GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA 3'
		RC	5' AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG 3'

Tabla 2: *Primers* utilizados en el método de Matsunaga de detección de especies animales. Para cada método se muestra el tamaño esperado del producto de PCR y la secuencia de los *primers*. Resaltados en celeste se encuentran los cebadores directos y en blanco los reversos para cada método.

8.6.1.2 Método de Bravi (PCR-RFLP):

También se llevo a cabo el método de detección de especies animales propuesto por Bravi *et al.* Con este fin en la PCR se utilizaron los cebadores universales, L y H, que hibridan con secuencias conservadas del gen *cyt b*, permitiendo la amplificación de un fragmento de ADN de 358 pares de bases. Al ser digerido con enzimas de restricción este fragmento da lugar a un patrón de bandas que serán propias de cada especie.

Para la reacción de PCR se utilizó el protocolo descrito en el apartado 8.6.1, con los *primers* L y H (ver Tabla 3). Los controles positivo y negativo fueron los mismos que en el método de Matsunaga para detección de *Bos taurus*, es decir un control positivo con ADN de vaca, y un control negativo con los mismos reactivos que el resto de los tubos pero sin ADN.

Los productos de PCR resultantes de esta amplificación fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hinfl* y *Alul*. Para ello, 20 de los 25 µl del producto de PCR fueron digeridos con 1µL de cada una de las enzimas las *Alul* y *Hinfl* (Fermentas) por separado, en presencia de 2,5 µL del Buffer 10X de reacción apropiado (NEB Buffer 2 para *Alul*) y (Buffer R para *Hinfl*) y 1,5 µL de H₂O mQ. A continuación se incubaron las reacciones a 37°C por 2 hs. Finalmente, se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida 12% para visualizar los productos resultantes de la digestión.

Primers utilizados en el Método de Bravi de detección de especies animales		
Amplicón	Primers	Secuencia
358 pb	L	5' CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3'
	H	5' CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3'

Tabla 3: *Primers* utilizados en el método de Bravi de detección de especies animales.

8.6.2 Detección de especie vegetal:

Para la detección de la especie vegetal *Glycine max* o soja se utilizaron cebadores que flanquean una porción del gen de la lecitina de soja. Este gen es característico de la

especie por lo que un amplicón del tamaño adecuado indica la presencia de soja en las muestras. La información de los *primers* se muestra en la tabla 3. El control positivo fue proporcionado por el tutor de esta tesis, y consiste en ADN purificado a partir de soja evento *RR*, que fue tratado como el resto de las muestras e incorporado en la corrida de PCR. El control negativo fue una vez más la reacción de PCR con todos los reactivos pero libre de ADN alguno.

Para la detección de *Glycine max*, las reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos de PCR a los que se le agregaron: 2,5 µL de Buffer 10X, 1,25 µL MgCl₂ 50 mM, 0,25 µL de dNTPs, 0,25 µL de la polimerasa Imolase (marca Boline 5U/µL), 1 µL del cebador directo Le1KVM164-F (10mM), 1 µL del cebador reverso Le1KVM164-R (10mM) y agua en csp 24 µL. Finalmente, en una zona separada, se agregó 1 µL de las diluciones 100 ng/ µL de los ADN extraídos de las muestras.

El termociclador se programó de la siguiente forma con una fase de desnaturalización inicial de 4 min a 94°C, seguida de 34 ciclos de 30 seg. a 94°C (desnaturalización), 30 seg a 62°C (hibridación de cebadores) y 30 seg a 72°C (elongación), finalizando con una elongación de 7 min a 72°C. El termociclador luego queda a una temperatura constante de 18°C hasta que se sacan las muestras.

Primers utilizados en la detección de especie vegetal			
Blanco	Amplicón	Primers	Secuencia
Gen de la Lecitina de Soja	102 pb	Le1KVM164-F	5'CTTTCTCGCACCAATTGACA3'
		Le1KVM165-R	5'TCAAACCTCAACAGCGACGAC3'

Tabla 3: Cebadores utilizados en la detección de la especie vegetal *Glycine max*.

8.6.3 Detección de transgénicos:

Con el objetivo de constatar la presencia de transgénicos se realizaron ensayos de *screening* utilizando el par de cebadores HA-nos 118F y HA-nos 118R, que permiten amplificar un fragmento de 118 pb perteneciente al terminador de la transcripción de la nopalina sintasa, *t-nos*. Para verificar estos resultados para algunas muestras también se llevó a cabo un segundo rastreo con los cebadores 35S-1 y 35S-2. Estos *primers* tienen

como blanco al promotor *p-35S* otro elemento también muy común en la mayoría de los eventos genéticamente modificados.

Las muestras fueron luego analizadas para identificar la presencia del evento transgénico GTS 40-3-2, para esto se utilizó un método específico de construcción que emplea los *primers* 35-soy (que hibrida con un segmento del promotor *p35S*) y CTP4 (que hibrida con el elemento que codifica el péptido señal de transporte al cloroplasto CTP4 proveniente de *Petunia hybrida*). En caso de estar presente en las muestras el ADN este evento, la PCR con estos cebadores da un producto amplicón resultante de 74 pb.

Para las amplificaciones en la detección de transgénicos, las reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos de PCR a los que se le agregaron: 2,5 µL de Buffer 10X, 1,25 µL MgCl₂ 50 mM, 0,25 µL de dNTPs, 0,25 µL de la polimerasa Imolase, cada uno de los dos cebadores apropiados de acuerdo a la estrategia (todos a 10 mM) y agua en csp 24 µL. Finalmente, en una zona separada, se agregó 1 µL de las diluciones 100ng/ µL de los ADN extraídos de las muestras. En todos los ensayos de transgenicidad se utilizaron los mismos controles positivo y negativo que para la detección de soja. Esta soja, evento *RR*, contiene todos los elementos blanco de las distintas amplificaciones, por lo que sirve como control positivo para todas ellas.

Primers utilizados para ensayos de transgenicidad:				
Método	Blanco	Amplicón	Primers	Secuencia
específico de construcción	construcción	74 pb	35soy	5' CATTTGGAGAGGACACGCTGA 3'
			CTP4	5' GAGCCATGTTGTTAATTTGTGCC 3'
<i>screening</i>	terminador <i>t-nos</i>	118 pb	HA-nos 118F	5' GCATGACGTTATTTATGAGATGGG 3'
			HA-nos 118R	5' GACACCGCGCGGATAATTTATCC 3'
<i>screening</i>	promotor <i>p-35 S</i>	195 pb	35S-1	5' GCTCCTACAAATGCCATCA 3'
			35S-2	5' GATAGTGGGATTGTGCGTCA 3'

Tabla 4: Cebadores utilizados en ensayo de transgenicidad. Se indica la secuencia de dichos cebadores y el tamaño esperado para los productos de amplificación; así como el tipo de método empleado y el blanco de amplificación. Todos estos análisis de transgénicos están basados en los métodos contenidos en la base de datos GMDD y validados en el JRC.

El termociclador se programó de la misma forma que para la detección de especies vegetales; con una fase de desnaturalización inicial de 4 min a 94°C, seguida de 34 ciclos de 30 seg. a 94°C (desnaturalización), 30 seg a 62°C (hibridación de cebadores) y 30 seg a 72°C (elongación), finalizando con una elongación de 7 min a 72°C. El termociclador luego queda a una temperatura constante de 18°C hasta que se sacan las muestras.

8.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 12%. Para realizar dichos geles se mezclaron 7 mL de acrilamida-bisacrilamida 12% con 7 µL de TEMED y 70 µL de Persulfato de amonio 10%. El gel se colocó en la cuba de electroforesis y se cargaron las muestras junto a un marcador de peso molecular (*Ladder* 100 o *Ladder* 50 el tamaño del amplicón esperado). Para preparar las muestras se utilizó el mismo buffer de carga que para los geles de agarosa. La corrida se realizó en buffer TBE 1X (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8.0) durante aproximadamente 1hr a 25 mA. Finalizada la corrida el gel se colocó 5 minutos en una solución fijadora de ADN (10% EtOH, 0.5% Ácido acético), 8 minutos en una solución de tinción con Nitrato de plata (0.2%), se enjuagó dos veces con agua y finalmente se colocó 5 minutos en solución reveladora (0.3% formaldehído, 3% NaOH) (Sanguinetti *et. al.*, 1994).

8.8 Secuenciado de productos de amplificación:

En aquellos casos donde el resultado obtenido lo ameritaba, se recurrió a la secuenciación automática de los productos de amplificación en el Insitut Pasteur de Montevideo. Previo al envío los amplicones fueron purificados siguiendo el protocolo PCR *Clean-Up Spin Protocol*, del kit *AXYPrep PCR Clean-Up kit* (AXYGEN). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del NCBI.

RESULTADOS Y DISCUSION:

9.1 Extracción de ADN:

9.1.1 Cuantificación y pureza: nanodrop

En la Tabla 6 se presentan los resultados de concentración y pureza de los ADN extraídos para las 18 muestras analizadas, tal como fueron obtenidos del Nanodrop. Se realizó una primera extracción con el Método Dellaporta modificado 1 en el que se obtuvieron concentraciones que varían desde 171 ng/μL hasta 4638 ng/μL, estando la mayor parte de las muestras en el orden de los mg/μL. Los valores de concentración obtenidos en el laboratorio para otras matrices por el mismo método de extracción Dellaporta modificado, son al menos diez veces menores, por lo que estas concentraciones parecen demasiado altas para ser reales. No obstante son el resultado de numerosas medidas en el equipo que fue previamente chequeado con controles de concentración conocida, por lo que pensamos que las muestras pueden estar contaminadas con compuestos que aumenten la A_{260} . Esta hipótesis resulta coherente si se observan las medidas de pureza (cociente A_{260}/A_{280}) que en muchos casos son también altas, dando relaciones cercanas a 2, que son los valores esperados para ARN puro. Dado que la mayor parte de estas muestras pertenecen a alimentos procesados, cocidos de carne picada y/o congelados su ARN estaría mucho más degradado que el ADN por lo que no esperamos contaminación por ARN pero si por otros contaminantes que tengan un espectro con alta absorbancia a 260nm y baja a 280nm. Dado que las concentraciones de la mayoría de las muestras están dentro del mismo orden, pensamos que el problema radica en el método de extracción que pueda estar dejando algún contaminante presente en las matrices, tal como se discute más adelante.

A esto se suma otro problema en el método de extracción, que tal como estaba planteado, dejaba una pasta de carne o soja poco homogénea con restos de tejido muy difíciles de romper. Por lo expuesto se decidió realizar una nueva extracción, siguiendo el protocolo Dellaporta modificado 2, descrito en la sección Materiales y Métodos. En este intento de optimización, el tejido se corta en trozos más pequeños y la *homogeneización* posterior se realiza con nitrógeno líquido para mejorar la disrupción mecánica. También se aumenta el tiempo de incubación con proteinasa K y se agrega una nueva etapa de desproteinización, para mejorar la eliminación de los contaminantes.

Concentración y pureza de los ADN extraídos							
# muestra	Tipo de producto	Extracción Dellaporta modificado 1			Extracción Dellaporta modificado 2		
		[ADN] (ng/μl)	Abs260 (UA)	Abs (260/280)	[ADN] (ng/μl)	Abs260 (UA)	Abs (260/280)
1	Hamburguesa de carne	3596	72	1,98	2956	59	2,05
2	Hamburguesa de carne	2003	40	1,81	805	16	1,71
3	Milanesa de soja	4462	89	1,05	4800	96	1,68
4	Hamburguesa de carne	2542	51	1,90	2536	21	1,98
5	Hamburguesa de carne	171	3	1,80	2198	44	2,06
6	Hamburguesa de carne	2734	55	2,06	1068	21	2,08
7	Hamburguesa de carne	2201	44	2,09	749	15	2,08
8	Hamburguesa de carne	304	6	1,88	4142	83	1,78
9	Milanesa de soja	4156	83	1,86	2889	58	2,05
10	Hamburguesa de soja	4638	93	1,32	4396	88	1,70
11	Milanesa de soja	2176	43	1,91	714	14	1,88
12	Tofu	1798	37	2,13	1325	27	2,06
13	Hamburguesa de carne	1429	29	1,98	1185	24	1,93
14	Hamburguesa de carne	365	7	1,87	1434	29	1,89
15	Panchos de soja	3367	8	1,97	1695	34	2,01
16	Hamburguesa de soja	3410	68	1,87	1442	29	1,89
17	Hamburguesa de carne	389	67	1,94	932	19	1,90
18	Hamburguesa de soja	4528	90	1,94	279	6	1,90

Tabla 6: Medidas de concentración (ng/L) y pureza (calculada como la relación entre absorbancias A₂₆₀/A₂₈₀) obtenidas del Nanodrop para los ADN extraídos por el método Dellaporta modificado 1 (columnas 3, 4 y 5) y Dellaporta modificado 2 (columnas 4, 5, y 6). Se mantuvo el código de colores de la tabla 1.

Los resultados de la extracción por el método Dellaporta modificado 2 también pueden observarse en la tabla 6. Durante la extracción, a simple vista, se observa que la utilización de nitrógeno líquido para la molienda de trozos más pequeños de muestra produce un polvillo fino más homogéneo que la pasta de carne o soja obtenida por el primer método. Esto es importante porque con las posteriores centrifugaciones, parte de este tejido se estaba perdiendo en los precipitados y por lo tanto la muestra no resultaba representativa. Así, vemos una mejoría en la confiabilidad de los resultados y por lo tanto en la calidad de extracción, aunque creemos que la representatividad de los resultados puede mejorarse aún más si se utiliza un homogeneizador de tejidos, como el *QIAGEN TissueRuptor*.

En cuanto a los resultados obtenidos en el Nanodrop, se observa que los valores de concentración siguen dentro del mismo orden; con algunas muestras aumentando su concentración y coeficiente A₂₆₀/A₂₈₀ y otras disminuyendo estos valores. No se observa mejora alguna en las medidas de pureza, de hecho en la segunda extracción hay una

mayor cantidad de muestras con valores menores al óptimo 1.8. Esto podría deberse en parte a la mayor homogeneidad de la muestra, porque de hecho al aumentar el tiempo de incubación con proteinasa K y al hacer una doble extracción con cloroformo: alcohol isoamílico se esperaba una menor cantidad de proteínas contaminantes y polifenoles. Así, este intento de optimización de la extracción no produjo los resultados esperados, la calidad del ADN es igual o peor con pocas matrices presentando el coeficiente de pureza óptimo. Tampoco parece haber relación alguna entre el tipo de matriz, de carne o de soja, más o menos procesada, cocida o no, con los valores de concentración y pureza. Aunque los productos basados en carne son los que presentan las menores concentraciones de ADN, sus purezas varían en gran medida.

Para intentar comprender a qué se deben las altas concentraciones y cuáles podrían ser los contaminantes de los ADN extraídos, se miraron los espectros de absorbancia de las distintas muestras y las absorbancias a 230nm (ver figuras 3 y 4 respectivamente). Para todas las muestras se observa el máximo absoluto a 260nm lo que estaría confirmando, que más allá de la presencia de contaminantes hay ADN en grandes concentraciones. Las absorbancias a 280nm no parecen ser excesivamente altas, sino más bien las esperadas para un ADN relativamente puro sin gran cantidad de proteínas. Sin embargo, sí parece haber contaminantes que estén absorbiendo a 230 nm. A esta longitud de onda tienen un alto coeficientes de absorción compuestos como el EDTA, la urea, los hidratos de carbono, los pequeños péptidos, los fenoles y varios compuestos aromáticos. Para muestras de ADN puro el cociente $A_{260/230}$ debería ser de aproximadamente 2,2. No obstante, se observan cocientes bastante menores para la mayor parte de las muestras, lo que estaría indicando la presencia de gran cantidad de este tipo de contaminantes. Para las muestras a menor concentración los picos a 230nm no disminuyen de forma proporcional, por lo que la proporción de contaminantes parecería ser mayor. La identidad de los mismos no debería ser de origen proteico dados los pasos de desproteinización doble y la cantidad de proteinasa K agregada en el método de Dellaporta modificado 2. Es más probable que en las muestras hayan quedado pequeñas cantidades de carbohidratos.

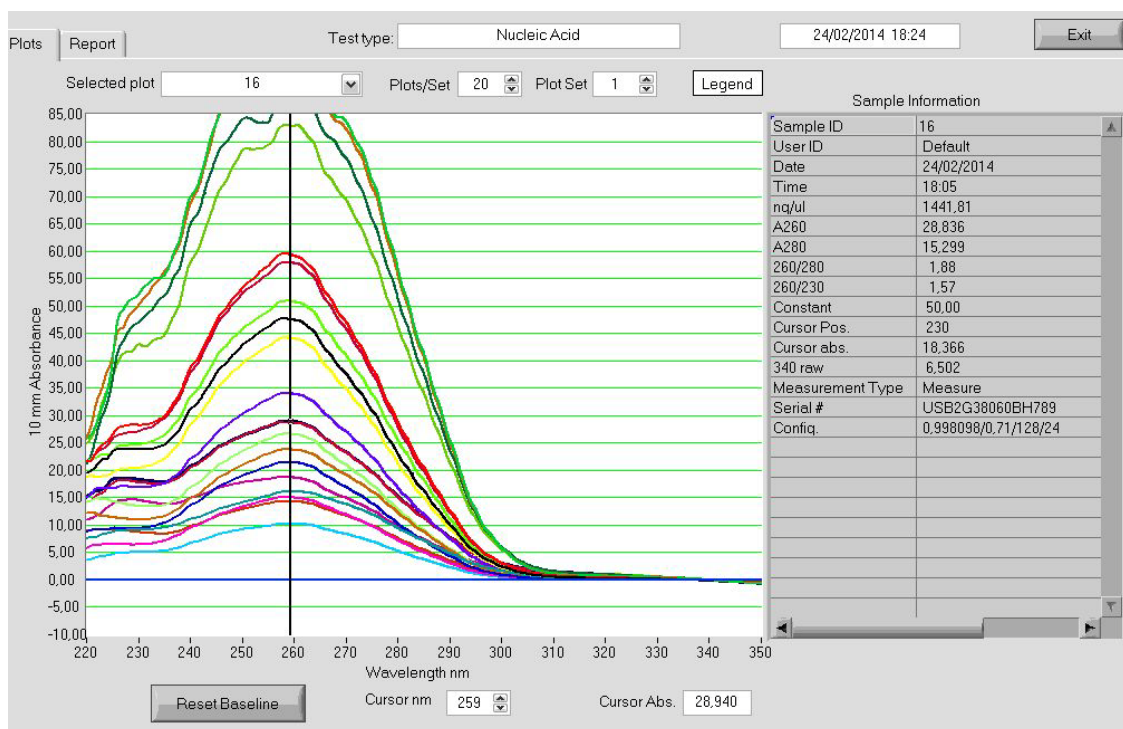


Figura 3: Captura de pantalla con los espectros de absorción de los ADN de todas las muestras extraídas por el método Dellaporta modificado 2. La línea vertical está ubicada a 259 nm.

Test type: Nucleic Acid 24/02/2014 18:26

Report Name: Report Full Mode: Ignore

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
	Default	24/02/2014	17:12	2371.31	47.426	23.057	2.06	1.99	50.00	230	23.829	0.365
1	Default	24/02/2014	17:14	2956.52	59.130	28.902	2.05	2.10	50.00	230	28.221	1.522
3	Default	24/02/2014	17:16	4799.74	95.995	57.028	1.68	1.85	50.00	230	52.004	3.966
3	Default	24/02/2014	17:18	4722.22	94.444	55.839	1.69	1.89	50.00	230	49.968	3.943
4	Default	24/02/2014	17:21	2536.02	50.720	25.595	1.98	2.05	50.00	230	24.692	1.725
2	Default	24/02/2014	17:34	804.66	16.093	9.419	1.71	1.76	50.00	230	9.142	0.619
6	Default	24/02/2014	17:38	1068.58	21.372	10.287	2.08	2.27	50.00	230	9.414	0.051
7	Default	24/02/2014	17:38	749.00	14.980	7.208	2.08	2.31	50.00	230	6.471	0.023
9	Default	24/02/2014	17:41	2889.29	57.786	28.130	2.05	2.13	50.00	230	27.078	1.433
10	Default	24/02/2014	17:43	4396.29	87.926	51.615	1.70	1.87	50.00	230	46.950	8.043
5	Default	24/02/2014	17:44	2197.83	43.957	21.373	2.06	2.15	50.00	230	20.421	0.972
8	Default	24/02/2014	17:45	4142.44	82.849	46.464	1.78	1.93	50.00	230	42.950	7.246
11	Default	24/02/2014	17:47	713.80	14.276	7.591	1.88	1.64	50.00	230	8.698	0.758
13	Default	24/02/2014	17:49	1185.17	23.703	12.298	1.93	2.15	50.00	230	11.003	0.171
11	Default	24/02/2014	18:00	512.19	10.244	5.244	1.95	2.05	50.00	230	5.003	0.017
15	Default	24/02/2014	18:00	1695.36	33.907	16.851	2.01	2.01	50.00	230	16.879	1.760
12	Default	24/02/2014	18:04	1325.45	26.509	12.892	2.06	1.97	50.00	230	13.484	0.111
14	Default	24/02/2014	18:05	1434.10	28.682	15.150	1.89	1.61	50.00	230	17.766	6.128
16	Default	24/02/2014	18:05	1441.81	28.836	15.299	1.88	1.57	50.00	230	18.366	6.502
17	Default	24/02/2014	18:09	931.55	18.631	9.819	1.90	1.28	50.00	230	14.529	6.331
19	Default	24/02/2014	18:10	2454.04	49.081	25.781	1.90	1.55	50.00	230	31.680	17.881
20	Default	24/02/2014	18:11	3050.02	61.000	31.505	1.94	2.14	50.00	230	28.517	-0.030
18	Default	24/02/2014	18:17	279.15	5.583	2.939	1.90	1.32	50.00	230	4.235	2.034

Figura 4: Captura de pantalla de los datos obtenidos del Nanodrop a partir de los cuales se realizaron los espectros de la figura 3. La identidad de las muestras se corresponde con las de la tabla 6 en orden correlativo; a excepción de las muestras 19 y 20 que luego no fueron analizadas.

9.1.2 Calidad del ADN:

Para visualizar la integridad del ADN se realizaron geles de Agarosa al 1% con tinción por el agente intercalante Bromuro de Etidio, que permite una muy buena visualización pero es altamente mutagénico.

En las Figuras 5, 6, 7 y 8 se muestran los geles para los ADN provenientes de las extracciones a partir de todas las muestras por el método Dellaporta Modificado 1 (Figuras 5 y 6) y por el método Dellaporta Modificado 2 (Figuras 7 y 8). Todos estos geles se realizaron aproximadamente un año después de la extracción de los ADN.

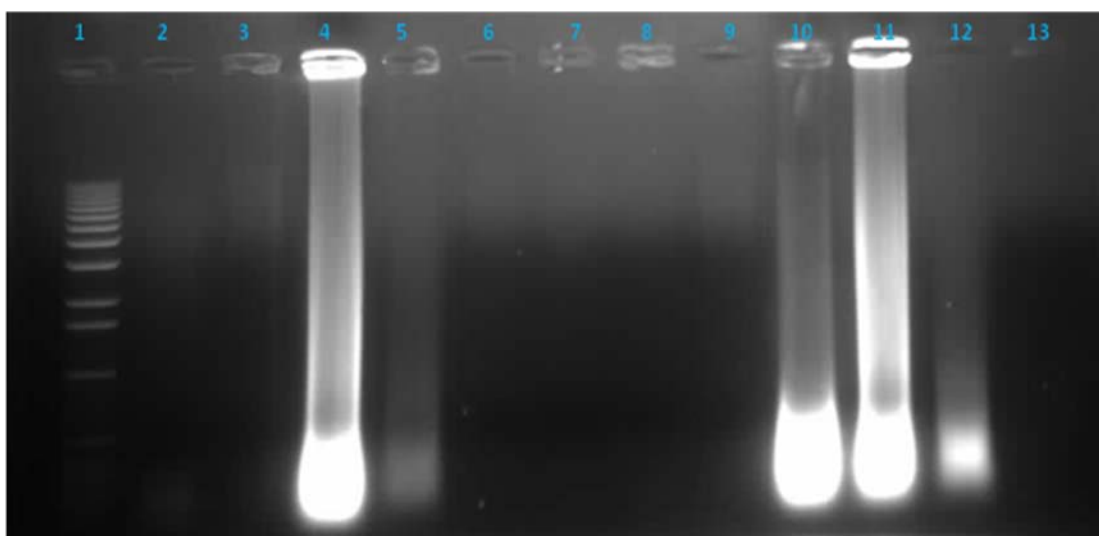


Figura 5: Gel de Agarosa al 1%. Se muestran los ADN provenientes de la primer extracción (Método Matsunaga modificado 1). Carril 1: MPM (1Kb) carril 2: muestra 1, carril 3: muestra 2, carril 4: muestra 3, carril 5: muestra 4, carril 6: muestra 5, carril 7: muestra 6, carril 8: muestra 7, carril 9: muestra 8, carril 10: muestra 9, carril 11: muestra 10, carril 12: muestra 11 (carril 13: vacío).

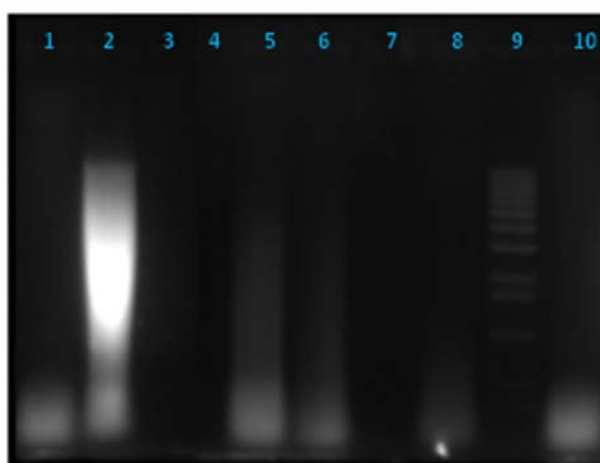


Figura 6: Gel de Agarosa al 1% donde se sembraron los ADN extraídos con el Método Matsunaga 1 de las muestras 12-18. Carril 1: muestra 12, carril 2: muestra 13, carril 3: muestra 14, carril 5: muestra 15, carril 6: muestra 16, carril 8: muestra 17, carril 9: MPM (1Kb), carril 10: muestra 18 (carriles 4 y 7 vacíos).

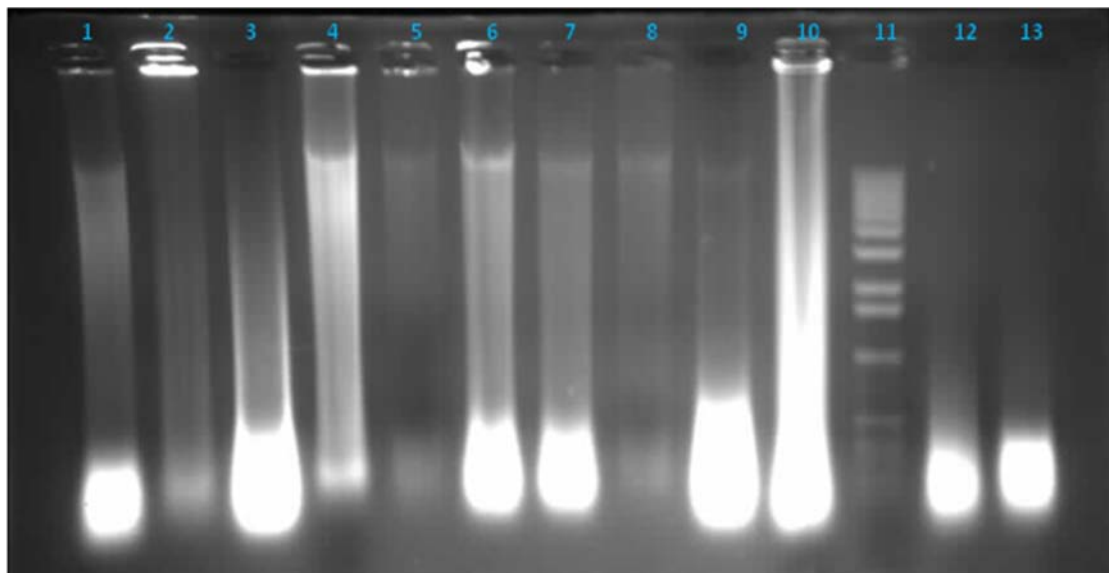


Figura 7: Gel de Agarosa al 1% con ADN extraídos por el Método (extracción 2): Carril 1: muestra 1, carril 2: muestra 2, carril 3: muestra 3, carril 4: muestra 4, carril 5: muestra 5, carril 6: muestra 6, carril 7: muestra 7, carril 8: muestra 8, carril 9: muestra 9, carril 10: muestra 10, carril 11: MPM 1Kb, carril 12: muestra 11, carril 13: muestra 12.

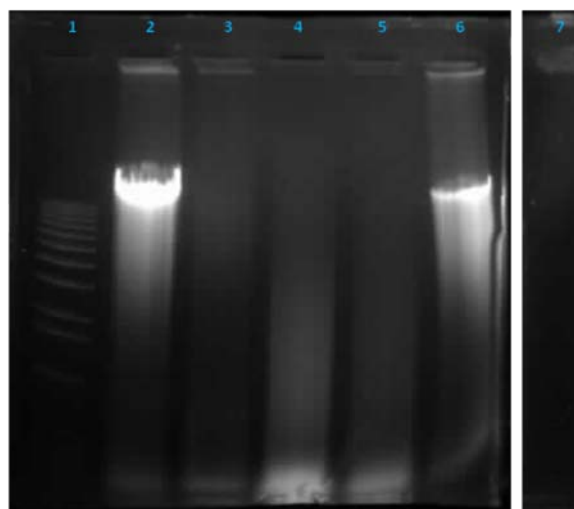


Figura 8: Gel de Agarosa al 1% donde se sembraron los ADN extraídos con el Método (extracción 2): Carril 1: MPM 1Kb, carril 2: muestra 13, carril 3: muestra 14, carril 4: muestra 15, carril 5: muestra 16, carril 6: muestra 17, carril 7: muestra 18. La muestra 18 fue corrida en otro gel, su MPM correspondiente alineaba bien con el de esta figura por lo que se muestran los resultados como si pertenecieran al mismo gel.

A simple vista se puede observar la presencia de ADN en altas concentraciones para la mayoría de las muestras, sobre todo en las extracciones por el método Dellaporta modificado 2 (figuras 7 y 8). Mirando la intensidad de las bandas en los distintos carriles es evidente que algunas muestras están más concentradas que otras. Dado que todos los carriles fueron sembrados con 5 μ L de las diluciones 100 ng/ μ L de los ADN (excepto para la muestra 14, figura 12 carril 3, para la que no había suficiente cantidad de ADN por lo que se sembraron 3 μ L), las concentraciones que indica el Nanodrop no son tan consistentes como se pensaba o están muy sobreestimadas por la presencia de contaminantes. Sin embargo, parte de estas discrepancias podrían atribuirse a una mayor distribución entre fragmentos de distintos tamaños o a errores del operador en el pipeteo. Esta situación ocurre principalmente con las muestras 3 y 10 de la primera extracción (Figura 5) y la muestra 2 de la segunda extracción (Figura 7) y en menor medida con las muestra 1, 4, 5, 6, 10, 13 y 17.

Para saber la concentración exacta de los ADN sembrados en este gel podrían sembrarse patrones de concentración conocida y comparar la intensidad de la fluorescencia emitida por el Bromuro de Etidio irradiado con luz UV de estos patrones con los de las muestras.

Aunque se sembraron las mismas concentraciones, según los datos del Nanodrop, la mayor parte de los carriles de las figuras 5 y 6, parecen estar menos concentrados que los de la primera extracción. Por este motivo, ya que no se puede visualizar de modo correcto el tamaño de los ADN extraídos y su integridad, para el análisis posterior de las figuras se toman en cuenta principalmente los resultados de la primer extracción.

Si bien hay una pequeña porción de ADN íntegro la mayor parte del ADN se encuentra altamente degradado. Parte de esta degradación se debe a que las muestras tenían aproximadamente un año de extraídas. Además, estas muestras fueron congeladas y descongeladas para su uso; aunque las muestras presentan distinto nivel de degradación y esto puede estar evidenciando el distinto nivel de degradación inicial de los ADN provenientes de las diferentes matrices. Las muestras 1, 2, 4, 5, y 6 (Figura 7), 13 y 17 (Figura 8) son las que presentan el menor nivel de degradación y todas corresponden a muestras de hamburguesas de carne. Así, el ADN de productos cárnicos se obtiene con mayor integridad que el ADN proveniente de productos basados en soja. Además de la matriz, otros factores que pudieron haber influido en el grado de degradación del ADN,

son el calor al que fueron expuestos varios de los productos de soja durante la cocción, o el tiempo que estuvieron muchos de estos productos congelados en los comercios. De hecho la degradación es muy común en productos altamente procesados y en aquellos que se conservan por largos periodos antes de consumirse como las hamburguesas congeladas (Anklam, 2002).

Para evitar o retrasar la degradación del ADN con el tiempo, en el laboratorio, se pudieron haber agregado inhibidores de nucleasas como el EDTA, que une Mg^{2+} y es un cofactor de muchas enzimas. Esto hubiera permitido utilizar los ADN de las muestras para otros ensayos. Sin embargo, esto solo podría realizarse para las alícuotas a ser corridas en electroforesis en geles de agarosa, y no para las que serán usadas en las amplificaciones, ya que el EDTA es un inhibidor de la PCR.

9.1.3 Controles de ADN de pollo:

Para hacer las extracciones se partió de la misma cantidad de muestra para ambos protocolos de extracción de manera de poder comparar tanto la cantidad como la calidad del ADN purificado a partir de ambos métodos. En la Tabla 7 se observa que el método de Dellaporta dio un mejor rendimiento en cuanto a la concentración de ADN, que el método de extracción por kit. Sin embargo, su pureza está muy por debajo del óptimo esperado de 1,8, por lo que el ADN probablemente esté contaminado con proteínas y su concentración este siendo sobreestimada. También es de destacar que las concentraciones de ADN que se obtienen son 10 veces menores que las que se obtuvieron para la mayoría de las muestras por el mismo método de extracción, lo que en parte se debe a la presencia de contaminantes que provocan la sobrestimación en la concentración de las muestras. La muestra de hígado de pollo tiene además la ventaja que se disgrega mucho más fácil que las muestras de carne. Por otra parte, el método de extracción por kit, si bien da concentraciones menores su pureza es óptima para ser utilizada como control, siempre que este ADN no esté completamente degradado.

ADN extraído de hígado de pollo			
	[ADN] (ng/μl)	Abs260 (UA)	Abs (260/280)
pollo A	277	5	1,44
pollo B	286	6	1,36
pollo A	168	3	1,89
pollo B	166	3	1,85

Tabla 6: Medidas de concentración (ng/L) y pureza (calculada como la relación entre absorbancias A260/A280) obtenidas del Nanodrop para los ADN extraídos de hígado de pollo a ser utilizados como control positivo de *Gallus gallus*. En naranja se resaltan los duplicados extraídos por el método Dellaporta modificado 1; en celeste los extraídos por el kit.

El gel de agarosa al 1% para las extracciones del ADN de hígado de pollo fue realizado en las mismas condiciones que los anteriores pero sembrando una menor cantidad de ADN (resultado no mostrado). Pudo verse la presencia de ADN degradado únicamente en las muestras A y B, mientras que ningún caso se observaron bandas de alto peso molecular. Sin embargo, este ADN pudo ser utilizado como control en los ensayos posteriores. Amplifico de modo adecuado a las concentraciones indicadas por el Nanodrop.

9.2 Amplificación por PCR:

Existen tres factores esenciales que determinan la eficiencia de la PCR. Estos son la cantidad, la pureza y la calidad del ADN extraído. Una vez que se logra obtener una cantidad suficiente para pasar el límite de detección característico de la PCR, los cebadores podrán pegarse a su ADN blanco y si éste está presente se obtendrá producto de amplificación. La concentración inicial del ADN determinará también la cantidad de producto amplificado. Como hemos descrito para casi todas las muestras se obtuvieron cantidades muy altas de ADN, por lo que en este sentido esperamos gran cantidad de producto amplificado.

La calidad del ADN está determinada por el largo de los fragmentos de ADN y por el grado de degradación y daño que este presenta. Por otra parte, la pureza del ADN extraído puede verse severamente comprometida por varios contaminantes presentes en las matrices alimentarias. Estos contaminantes pueden provenir de la matriz en si, como ser polisacáridos, lípidos y polifenoles, o pueden ser adquiridos durante el proceso de extracción, (Anklam *et. al.*, 2002). Si bien hemos discutido que los ADN se encuentran degradados y con una pureza muy baja, en todos los casos sirvieron como molde de amplificación. Siempre que estaba presente el ADN se observó señal, aunque en algunos casos puede que la intensidad de esta señal haya sido menor a la esperada por estar el ADN parcialmente degradado y no haber suficientes fragmentos intactos que contuvieran intacto la secuencia de interés. Además, los amplicones esperados resultaron ser lo suficientemente pequeños como para funcionar con estas matrices de ADN degradado.

En cuanto a los contaminantes, podemos asegurar que si bien parecen estar presentes en grandes cantidades, no inhiben o interfieren con la reacción enzimática de la ADN polimerasa porque para todas las muestras se observó amplificación en al menos uno de los análisis realizados. Así, en aquellos casos en que las muestras no amplificaron, esto probablemente se debió a que no contenían la secuencia apropiada para actuar como molde y no a que la reacción de la PCR estuviera siendo inhibida por componentes de la matriz. Aunque es de destacar que con esto no se descartan otros motivos, como la falta de amplificación por la ausencia de algún reactivo debida a errores del operador. Para descartar esto, los ensayos, sobre todo aquellos con resultados dudosos fueron repetidos para confirmar los hallazgos. No se realizó un ensayo de inhibición (ver por ejemplo Arleo *et al.*, 2012) porque todas las muestras analizadas amplificaron en al menos una reacción de PCR.

9.2.1 Matsunaga para detectar *Bos taurus*:

Los ADN extraídos a partir de las 18 muestras fueron primero analizados en cuanto a su contenido en especies. Los resultados de la PCR utilizando los cebadores desarrollados por Matsunaga para la detección de *Bos taurus* se muestran en las figuras 10, 11 y 12.

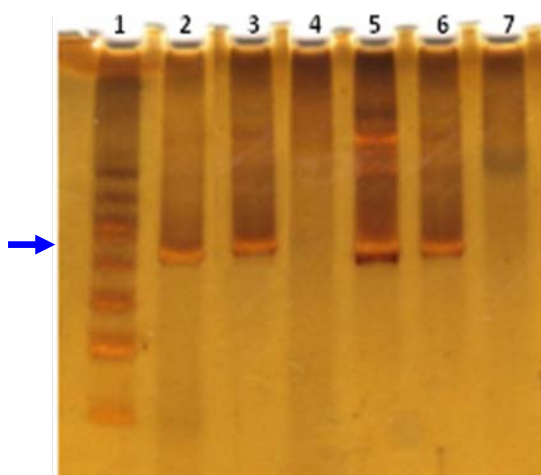


Figura 10: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación de las muestras 1-4, utilizando como cebadores Fsim y Rk. **Carril 1:** MPM 100pb; **Carril 2:** muestra 1; **Carril 3:** muestra 2; **Carril 4:** muestra 3; **Carril 5:** muestra 4; **Carril 6:** Control positivo (ADN de vaca); **Carril 7:** Control negativo (sin ADN).

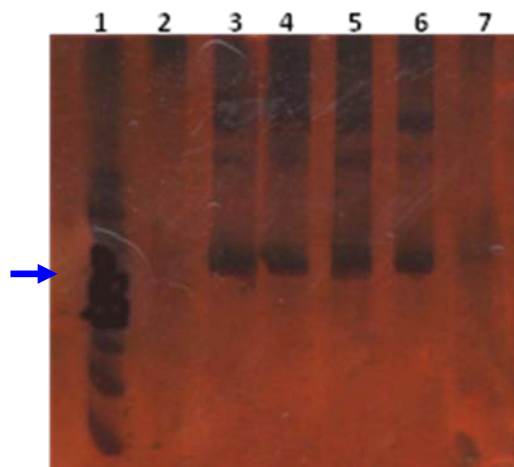


Figura 11: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación de las muestras 5-8, utilizando como cebadores Fsim y Rk. **Carril 1:** MPM 100pb; **Carril 2:** muestra 5; **Carril 3:** muestra 6; **Carril 4:** muestra 7; **Carril 5:** muestra 8; **Carril 6:** Control positivo (ADN de vaca); **Carril 7:** Control negativo (sin ADN).

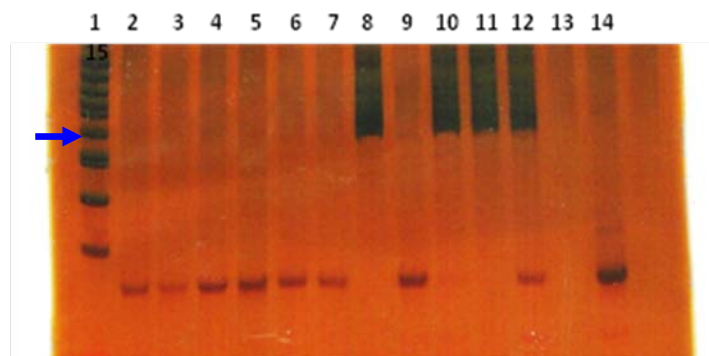


Figura 12: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación de las muestras 9-18, utilizando como cebadores Fsim y Rk. **Carril 1:** MPM 100pb; **Carril 2:** muestra 9; **Carril 3:** muestra 10; **Carril 4:** muestra 11; **Carril 5:** muestra 12; **Carril 6:** muestra 15; **Carril 7:** muestra 16; **Carril 8:** muestra 13; **Carril 9:** muestra 18; **Carril 10:** muestra 14; **Carril 11:** muestra 17; **Carril 12:** Control positivo (ADN de vaca); **Carril 13:** vacío **Carril 14:** Control negativo (sin ADN); **Carril 15:** vacío.

La utilización de cebadores especie-específicos requiere que en paralelo se corran controles positivos y negativos que descarten la posibilidad de obtener resultados falsos debido a que el método en si no esté funcionando del modo adecuado. Por este motivo se sembraron, al igual que para el resto de los análisis de este trabajo, un control positivo con la especie esperada, que en este caso fue ADN de vaca sembrado en los carriles 6, 6, y 12 de las figuras 10, 11 y 12, respectivamente. Estos controles dieron en todos los casos resultados positivos, con amplicones de 274 pb, confirmando que la PCR y

visualización por gel funcionan del modo correcto y producen el resultado esperado en caso de estar presente el ADN de esta especie. Como control negativo se llevo a cabo la reacción con todos los reactivos, a excepción del ADN. Estos controles están sembrados en los carriles 7, 7 y 14 de las figuras 10, 11 y 12 respectivamente y dieron todos negativos, permitiendo comprobar que si el ADN no está presente, no se obtienen falsos positivos.

Para estas amplificaciones se esperaba un amplicón de 274 pb, que según los marcadores de peso molecular corresponde, de forma aproximada, a los sitios marcados por las flechas.

Se observan productos de amplificación con el tamaño esperado para las muestras 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14 y 17 que son precisamente las muestras que declaran contener ADN de vaca, o que, sin etiqueta, fueron vendidas por comerciantes que así lo declaraban. Mientras que las muestras que no afirman contener esta especie, es decir las muestras 3, 9, 10, 11, 12, 15, 16, y 18 (ver tabla 1) no presentan banda del tamaño esperado. De este modo no se observan discrepancias entre los resultados y declarado para ninguna de las muestras. Esto es lógico, considerando la especie en estudio; la ausencia total de carne vacuna en cualquiera de las muestra sería evidente, mientras que no produciría ningún rédito económico adulterar un producto de soja con carne.

Cabe destacar que para todos los casos en que los resultados dieron positivos, además de la banda con el tamaño esperado se observan bandas con mayor peso molecular, esto se podría deberse a inespecificidades de la reacción. Además, en la figura 12 se observa una banda de peso molecular constante y menor a 100 pb para todas las muestras que dieron resultado negativo. Considerando su tamaño y dado que esta banda no está presente en aquellas muestras con resultado positivo, creemos que pueden corresponder a cebadores que al no encontrar su ADN blanco de hibridación en las muestras negativas, formaron dímeros entre sí.

9.2.2 Matsunaga para detectar de *Gallus gallus*:

A continuación los ADN extraídos a partir de todas las muestras fueron analizados por el método Matsunaga Pollo para determinar si contenían o no la especie *Gallus gallus*. Los resultados de la PCR utilizando los cebadores Fsim y Rc fueron registrados pero no se muestran. Para ninguna de las muestras de soja aparece la banda esperada de 224 pb, por lo que ninguno de estos productos contiene la especie. Todas las hamburguesas de carne analizadas en este estudio declaran contener ganado vacuno, por lo que en ninguna de ellas se esperaba encontrar la presencia de *Gallus gallus*. Sin embargo la muestra 5 resultó ser positiva, dando una banda de gran intensidad a la altura correspondiente a 224 pb.

En cuanto a los controles que permiten asegurar la veracidad de los resultados para este estudio, el control negativo efectivamente dio negativo, y el control positivo, muestra A del ADN purificado a partir de hígado de pollo por el método de kit (ver sección 8.4.1), también dio como era esperado. No obstante, debido a que los métodos Matsunaga vaca y Matsunaga pollo comparten el primer directo Fsim, queríamos descartar la posibilidad de que el cebador reverso de pollo Rc estuviera hibridando a esta temperatura (62°C) con la secuencia del ADN de vaca; (dando un resultado positivo cuando las muestras contienen vaca y no pollo). Por este motivo, en paralelo a las demás reacciones también corrimos un control de reacción cruzada que contiene únicamente ADN de vaca y solo los cebadores Fsim y Rc. Dada la ausencia en este control del cebador reverso Rk, esperábamos que diera negativo. Sin embargo se obtuvo un resultado positivo. La PCR fue repetida varias veces, con ADN de extracciones y diluciones distintas tanto para el control de vaca como para la muestra 5. En todos los casos el resultado fue el mismo, tanto la muestra 5 como el control de reacción cruzada dieron positivo. Dada la importancia de este control para asegurar que la muestra 5 efectivamente está adulterada o contaminada con pollo, se realizó una PCR con gradiente de temperaturas.

Con el termociclador Axygen MaxyGene Gradient, se probaron, en la misma corrida de PCR, varias Tm: 62°C, 64°C, 65°C; 66°C y 68°C. A todas estas temperaturas, se corrieron los controles positivo, negativo y de reacción cruzada junto a la muestra 5; y en algunos casos también se corrieron algunas de las muestras que habían dado negativo para comparar. En la figura 13 se observan en un mismo gel, los productos de amplificación de la PCR realizada a la temperatura original (62°C) y de la PCR realizada a la temperatura a

la que se obtuvo una reacción cruzada menos intensa (65°C). Las bandas menores a 50 pb corresponden a los dímeros de cebadores ya discutidos. La única otra banda que aparece es la que esperada para *Gallus gallus* a 224 pb. Dicha banda aparece en los carriles 5, 6, 7, 10, 11 y 12; mientras que el resto de las muestras, y el control sin ADN dieron negativo. Los carriles 7 y 12 son los que tiene mayor intensidad de banda a 224 pb y corresponden al control positivo con ADN puro de pollo. Las bandas 6 y 11 le siguen a las anteriores en intensidad y ambas corresponden a la muestra 5. Finalmente, en los carriles 5 y 10 están sembradas las diluciones del ADN de vaca. Como era esperado, de los controles de reacción cruzada, el realizado a 65°C presenta una intensidad menor que la especificidad de la reacción aumenta al aumentar la temperatura.

En el carril 4, se encuentra sembrada la muestra 3 que corresponde a una hamburguesa de soja, por lo que se comprueba que esta matriz efectivamente no contiene pollo. La muestra 2, sembrada en el carril 3, es una hamburguesa de carne que como ya se ha mencionado no contiene *Gallus gallus*. Sin embargo resulta extraño que las hamburguesas de carne de ganado vacuno, que ya se ha comprobado contienen *Bos taurus*, no presenten reacción cruzada y el control con ADN de la misma especie de sistemáticamente positivo.

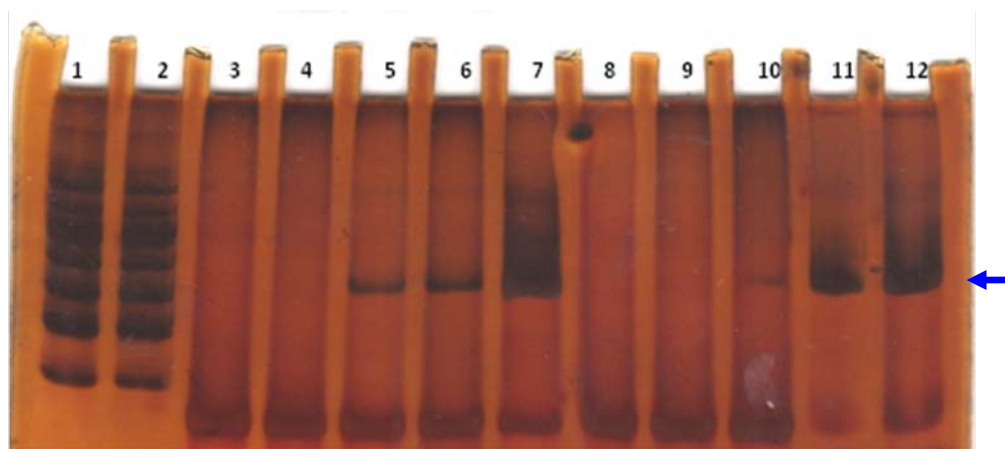


Figura 13: Gel de poliacrilamida 12% teñido con AgNO_3 , de los productos de PCR obtenidos en la amplificación en gradiente por el método Matsunaga pollo; utilizando como cebadores Fsim y Rc. En los carriles 3-8 el ciclado fue realizado con una T_m (temperatura de fusión) de 62°C; para los carriles 9-12 la T_m fue 65°C. **Carril 1:** MPM 100pb; **Carril 2:** MPM 100pb; **Carril 3:** muestra 2; **Carril 4:** muestra 3; **Carril 5:** Control de reacción cruzada a 62°C (ADN de vaca); **Carril 6:** muestra 5; **Carril 7:** Control positivo (ADN de pollo); **Carril 8:** Control negativo (sin ADN); **Carril 9:** muestra 2; **Carril 10:** Control reacción cruzada a 65°C (ADN de vaca); **Carril 11:** muestra 5; **Carril 12:** Control positivo (ADN de pollo).

9.2.3 Método de Bravi:

Para corroborar los resultados obtenidos por el método Matsunaga se llevó a cabo la técnica de PCR-RFLP propuesta por Bravi. Sin embargo, según los hallazgos de Miller (Lic. Agustín Miller, tesis de grado, 2010), este método tiene un límite de detección mucho menor que el método de Matsunaga. Por este motivo, el análisis sólo se llevó a cabo para las primeras 8 muestras obtenidas, el resto de los ADN extraídos solo se analizaron por el método Matsunaga. No obstante, como veremos a continuación, se logró comprobar que por ambos métodos se obtienen los mismos resultados.

En las figuras 14 y 15, se presentan los resultados obtenidos tras la PCR con los cebadores universales L y H. Dado que la banda de 358 pb del gen *cyt b* solo se espera para especies de vertebrados; las muestras que solo contienen soja no deberían presentarla. Por lo tanto primero se corrieron geles de poliacrilamida, con los productos de amplificación de Bravi y luego las muestras positivas se incubaron con las enzimas de restricción según lo descrito en la sección 8.6.1.2 de Materiales y métodos.

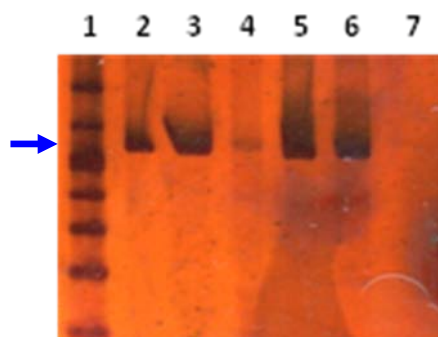


Figura 14: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación de las muestras 1-4, utilizando como cebadores L y H. **Carril 1:** MPM 100pb; **Carril 2:** muestra 1; **Carril 3:** muestra 2; **Carril 4:** muestra 3; **Carril 5:** muestra 4; **Carril 6:** Control positivo (ADN extraído de vaca); **Carril 7:** Control negativo (sin ADN).

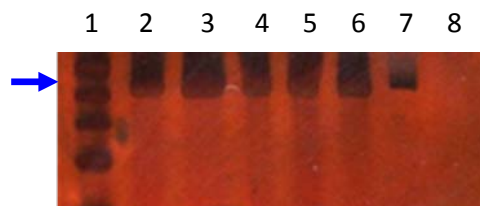


Figura 15: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación de las muestras 5-8, utilizando como cebadores L y H. **Carril 1:** MPM 100pb; **Carril 2:** muestra 5; **Carril 3:** muestra 6; **Carril 4:** muestra 7; **Carril 5:** muestra 8; **Carril 6:** Control positivo (ADN extraído de vaca); **Carril 7:** Control negativo (sin ADN).

Como se observa en la figura 14, para las muestras 1, 2, y 4 en el gel aparecen bandas de gran intensidad a la altura esperada (358 pb). Estos resultados positivos coinciden con lo declarado ya que las tres muestras son hamburguesas de carne. La muestra 3, que presenta una banda de menor intensidad a la misma altura, fue clasificada como un resultado dudoso y también fue digerida con las enzimas de restricción. Esta muestra corresponde a una hamburguesa de soja por lo que no se esperaba que apareciera dicha banda. Además, en los carriles 6 y 7 de las figuras y , se observan los controles positivo y negativo respectivamente. Estos controles dan los resultados esperados validando los resultados del método.

Para las muestras 5-8 (ver figura 15) también se observan bandas de alta intensidad con el tamaño esperado para el amplicón. Dado que todas estas muestras han sido elaboradas con carne de vaca, los resultados coinciden con lo esperado, y con los hallazgos encontrados por el método Matsunaga. Sin embargo, en esta etapa del método, no se puede comprobar a que especie de vertebrado corresponden dichas bandas. Por ejemplo, para la muestra 5, según los hallazgos anteriores, esta banda debería corresponder tanto al fragmento del gen de vaca como al de pollo.

Si bien el método diseñado por Bravi *et al.* utiliza las enzimas de restricción *AluI*, *HaeIII* y *HinfI*; para la digestión de los fragmentos de amplificación aquí solo se usaron *HinfI* y *AluI* debido a que con estas dos ya se pueden discriminar las especies vaca y pollo. Según lo descrito por el método original, el patrón de corte de la enzima *HinfI* (patrón h) permite discriminar pollo del resto de las especies de vertebrados: caballo, oveja, burro, perro, gato, conejo, cerdo, vaca y humanos. No ocurre lo mismo con la especie *Bos taurus*, que digerido con *HinfI* da un patrón de exactamente igual al de *Equus asinus* (burro). Por lo que para asegurar la presencia del primero y la ausencia del segundo hizo falta la digestión con otra enzima de restricción: *AluI*. El patrón de corte de *AluI* si es característico de *Bos taurus*.

Tras la digestión de los productos de amplificación con *AluI* se obtuvieron patrones similares para las muestras 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8. Estos patrones presentaron tres bandas en todos los casos; con tamaños aproximados de 200 pb, 150 pb y 350 pb. La banda de mayor peso molecular corresponde al fragmento de la amplificación sin digerir (358 pb). Mientras que las dos bandas de menor peso molecular corresponden al patrón b de Bravi perteneciente a *Bos taurus*, con una banda de 190 pb y otra de 168 pb. En realidad estas dos bandas también podrían ser las esperadas para la especie *Felis catus* (Gato), de 190

pb y 148 pb; que de hecho tienen tamaños más similares a los encontrados; sin embargo, dado que no se observa la tercer banda de 120 pb que caracteriza a esta última especie, concluimos que efectivamente estamos ante la presencia de la especie *Bos taurus* en todos los casos. Estos resultados podrían comprobarse en la digestión con la enzima *Hinfl*. Desafortunadamente, en el gel con los productos de digestión de esta enzima solo se obtuvieron las bandas originales de PCR, incluso para los controles positivos de pollo y vaca. Esto indica que la enzima no funcionó de forma correcta.

Es de destacar que para la digestión de la muestra 3 con *AluI* no se obtuvo ninguna banda. Incluso si la digestión en ese tubo no hubiera funcionado de forma correcta, esperábamos ver la banda de 358 pb original. Dado que dicha banda no se observa concluimos que nunca hubo amplificación y que en el gel de la figura 14, la banda de menor intensidad observada para esta muestra, pudo deberse a un sembrado incorrecto de los productos de amplificación, causando que parte de la muestra 2 o de la 4 quedaran sembradas en el carril 4. Esto explicaría no solo la poca intensidad de las bandas en ese carril (en donde prácticamente solo se observa la banda a 358 pb), sino también la inconsistencia con los resultados obtenidos por el método de Matsunaga para la misma muestra. De hecho, es más lógico que una hamburguesa de soja no contenga carne.

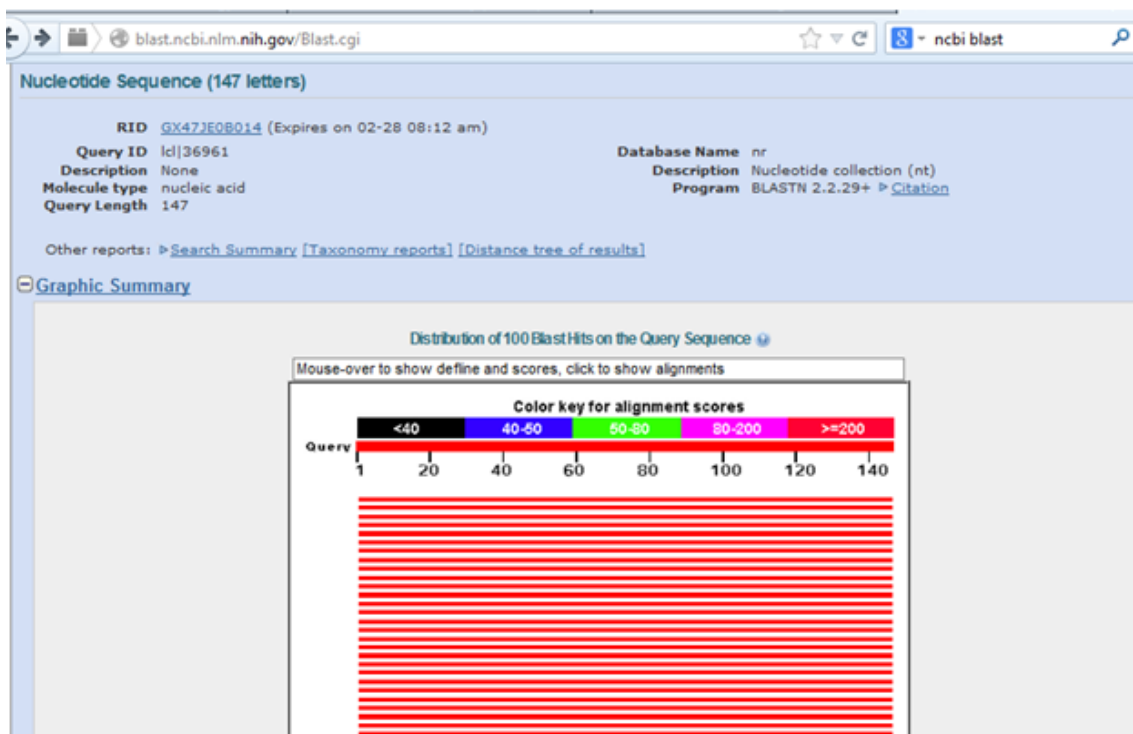
9.3 Secuenciación de la muestra 5:

Dado que con el método Matsunaga pollo se obtuvieron resultados positivos para la muestra 5 (aunque con un control de reacción cruzada también positivo), y considerando que el método de Bravi que utilizamos para corroborar estos resultados no funcionó; decidimos secuenciar esta muestra. Se secuenció el producto obtenido de la amplificación de la muestra 5 con los primers Fsim y Rc (cebadores del método Matsunaga pollo). La secuencia que nos enviaron desde el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur fue introducida en la base de datos del NCBI obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 16.

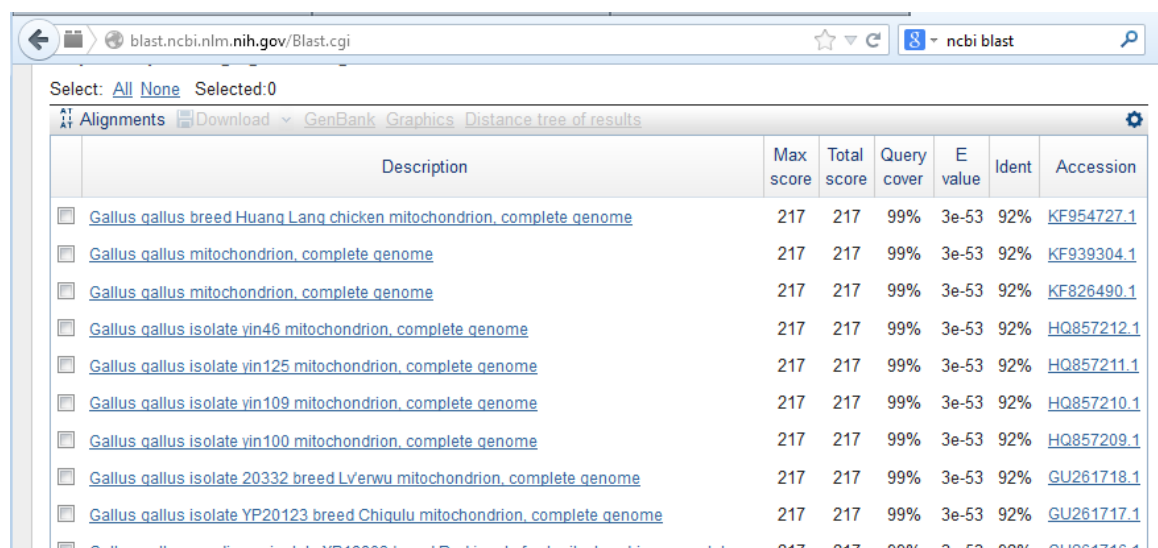
Como se observa en la figura, el alineamiento de nucleótidos (*nucleotide blast*) utilizando la base NCBI, confirma sin lugar a dudas que la muestra 5 efectivamente contiene ADN de la especie *Gallus gallus*. Sin embargo es importante considerar que al igual que los demás métodos de análisis llevados a cabo en este trabajo, este estudio es meramente cualitativo; permite investigar la presencia o ausencia de *Gallus gallus*, pero no permite cuantificarlo. Solo podemos asegurar que las cantidades de pollo y de vaca en la muestra

son suficientes como para pasar el límite de detección del método de Matsunaga pollo, pero no podemos saber la proporción del mismo en la muestra, es decir si la muestra 5 es una hamburguesa de vaca contaminada con pollo, o si en realidad podría clasificarse como hamburguesa de pollo. La cuantificación permitiría por ejemplo saber si esta hamburguesa, declarada como de carne vacuna, fue manipulada de forma fraudulenta con una especie más económica agregada en grandes cantidades, o si en realidad se trata de una contaminación debida a la falta de higiene en la manipulación de los alimentos. Es decir, que por ejemplo, los guantes, o cuchillas, utilizadas en la elaboración de esta hamburguesa de carne hayan tenido restos de pollo al momento de la elaboración. De hecho sabemos que esta hamburguesa fue manufacturada en un comercio de las inmediaciones de la facultad de ciencias por lo que se reforzaría la hipótesis de que estamos en presencia de una contaminación debida a malas prácticas de manufactura.

a)



b)



The screenshot shows the NCBI BLAST results page. At the top, there's a navigation bar with 'blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi' and a search bar. Below that, there's a 'Select: All None Selected:0' section. The main table has columns: Description, Max score, Total score, Query cover, E value, Ident, and Accession. The table lists several alignments for Gallus gallus mitochondrial genomes, all with a Max score of 217, Total score of 217, Query cover of 99%, E value of 3e-53, and Ident of 92%.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Gallus gallus breed Huang Lang chicken mitochondrion, complete genome	217	217	99%	3e-53	92%	KF954727.1
Gallus gallus mitochondrion, complete genome	217	217	99%	3e-53	92%	KF939304.1
Gallus gallus mitochondrion, complete genome	217	217	99%	3e-53	92%	KF826490.1
Gallus gallus isolate yin46 mitochondrion, complete genome	217	217	99%	3e-53	92%	HQ857212.1
Gallus gallus isolate yin125 mitochondrion, complete genome	217	217	99%	3e-53	92%	HQ857211.1
Gallus gallus isolate yin109 mitochondrion, complete genome	217	217	99%	3e-53	92%	HQ857210.1
Gallus gallus isolate yin100 mitochondrion, complete genome	217	217	99%	3e-53	92%	HQ857209.1
Gallus gallus isolate 20332 breed L'werwu mitochondrion, complete genome	217	217	99%	3e-53	92%	GU261718.1
Gallus gallus isolate YP20123 breed Chigulu mitochondrion, complete genome	217	217	99%	3e-53	92%	GU261717.1
Gallus gallus anasae isolate YP10002 breed Red jungle fowl mitochondrion, complete genome	217	217	99%	3e-53	92%	GU261716.1

Figura 16: Capturas de pantalla del NCBI *nucleotide blast*, (a) se muestran los valores de alineamiento y la distribución. (b) La secuencia corresponde al genoma mitocondrial de la especie *Gallus gallus*.

9.2.4 Detección de soja:

Analizado el contenido en especies animales de estas muestras, se procedió a investigar su contenido en especies vegetales, en particular la presencia de *Glycine max*. Con este fin, se llevó a cabo la amplificación por PCR con el par de cebadores LE1KVM164F y LE1KVM165R que flanquean una porción del gen de la lecitina de soja, característico de la especie. Si bien en la literatura se encuentran disponibles una gran cantidad de cebadores que flanquean secuencias de este mismo gen, como LE1 (5'-GAAGCAACCAACATGATCCTC-3') y LE2 (5'-ATGGATCTGATAGAATTGACGTTA-3') que amplifican una secuencia de 407 pb del gen de la lecitina (Hurst, Knight & Bruce, 1999); decidimos usar aquellos que estuvieran validados por la UE (JRC Reference Report) y dieran el amplicón de menor tamaño.

En las figuras 18, 19 y 20 puede observarse el análisis de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Siempre que el ADN contenga una secuencia complementaria a los cebadores LE1KVM164F y LE1KVM165R se verá una banda de 102 pb. Como podemos observar en la figura 18, este es el caso de las muestras 1, 3 y el control positivo con ADN de soja. Las muestras 2 y 4 no parecen contener ADN de *Glycine max* ya que, al igual que el control negativo no presentan dicha banda. Además,

la matriz de la muestra 4, perteneciente a una hamburguesa de carne, parece contener varias secuencias de ADN capaces de hibridar con los cebadores utilizados, ya que se ven varias bandas inespecíficas con tamaños superiores al esperado.

En el gel de la figura 19, el control negativo, al igual que las muestras 13 y 14 (carriles 14, 12 y 13, respectivamente) presentan una ausencia total de bandas. Mientras que para las muestras 5, 6, 7, 10, 11 y 12 se observan bandas de aproximadamente 102 pb (tamaño marcado por la flecha), que al ser comparadas con el control positivo (carril 10), resultan lo suficientemente intensas como para asignarles un resultado positivo. No ocurre lo mismo con las muestras 8 y 9, que a la altura esperada, presentan sombras más que bandas. Estas muestras fueron clasificadas como resultados dudosos y se volvieron a analizar. Esta amplificación se observa en la figura 20; donde vemos la presencia de bandas de alta intensidad, tanto para la muestra 8 como para la 9 (carriles 3 y 4 respectivamente).

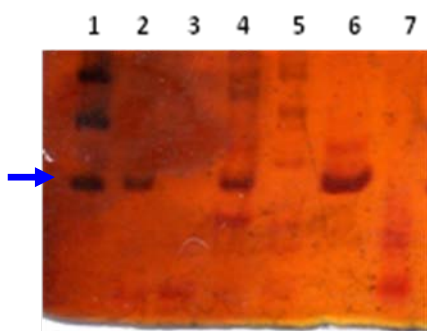


Figura 18: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación de las muestras 1-4, utilizando como cebadores LE1KVM164F y LE1KVM165R. **Carril 1:** MPM 100pb; **Carril 2:** muestra 1; **Carril 3:** muestra 2; **Carril 4:** muestra 3; **Carril 5:** muestra 4; **Carril 6:** Control positivo (ADN extraído de soja RR); **Carril 7:** Control negativo (sin ADN).

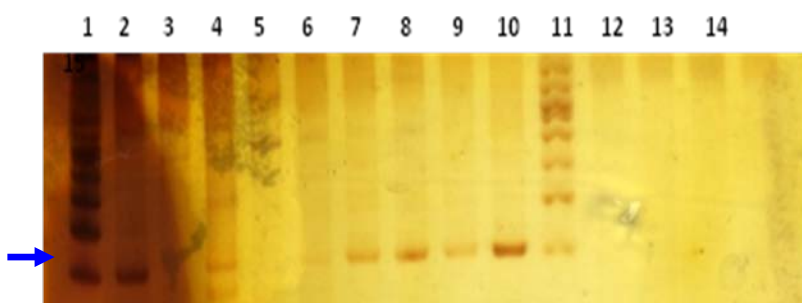


Figura 19: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación de las muestras 5-14, utilizando como cebadores LE1KVM164F y LE1KVM165R. **Carril 1:** MPM 100pb; **Carril 2:** muestra 5; **Carril 3:** muestra 6; **Carril 4:** muestra 7; **Carril 5:** muestra 8; **Carril 6:** muestra 9; **Carril 7:** muestra 10; **Carril 8:** muestra 11; **Carril 9:** muestra 12; **Carril 10:** Control positivo (ADN extraído de soja RR); **Carril 11:** MPM 100pb; **Carril 12:** muestra 13; **Carril 13:** muestra 14; **Carril 14:** Control negativo (sin ADN).

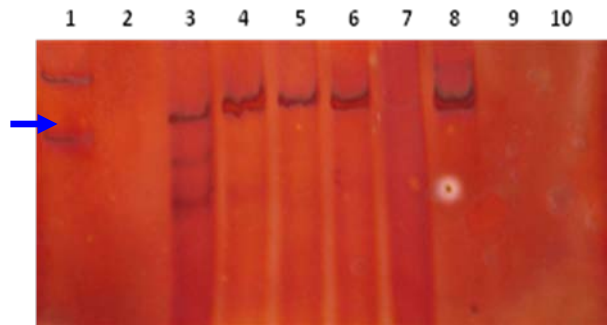


Figura 20: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación obtenidos con los cebadores LE1KVM164F y LE1KVM165R. **Carril 1:** MPM 100pb; **Carril 2:** vacío; **Carril 3:** muestra 8; **Carril 4:** muestra 9; **Carril 5:** muestra 15; **Carril 6:** muestra 16; **Carril 7:** muestra 17; **Carril 8:** Control positivo (ADN extraído de soja *RR*); **Carril 9:** Control negativo (sin ADN); **Carril 10:** vacío.

En el carril 8 se encuentra sembrado el control positivo, con el mismo ADN de soja *RR* utilizado como control en el resto de los geles. A la altura de este control positivo son 4 las muestras que presentan bandas de gran intensidad; las muestras 8 y 9 ya mencionadas, así como las muestras 15 y 16; ambas pertenecientes a productos de soja. Para la muestra 17 al igual que para el control negativo, no se observa banda de 102 pb. Si bien los resultados para la muestra 18 no se muestran en estas figuras, también fueron realizados, dando un resultado positivo que coincide con lo esperado para una muestra de hamburguesa de soja.

Resumiendo los resultados las figuras 18, 19 y 20 podemos concluir que de las 10 muestras de hamburguesas de carne analizadas, la mitad (muestras 1, 5, 6, 7 y 8) contienen proteína de soja. Cuatro de estas muestras (1, 6, 7 y 8) declaran contener proteína de soja o proteína vegetal; para la quinta no hay información disponible, ya que se vende como hamburguesa de carne suelta pero no se proporciona un empaque con lista de ingredientes. Así, en ningún caso se observan diferencias entre lo declarado por los comerciantes y lo encontrado en este estudio. Además, como era esperado, todas las muestras elaboradas en base a proteína de soja dieron resultados positivos la especie *Glycine max*.

9.2.5 Detección de transgénicos:

9.2.5.1 Rastreo del terminador *t-nos*:

En las figuras 21 y 22 se observan los resultados para el rastreo inicial de transgénicos enfocado en detectar la presencia del terminador *t-nos* de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*. El producto de amplificación con los cebadores HA-nos 118F-R tiene un tamaño esperado de 118 pb. Además de permitir la detección de una gran cantidad de variantes transgénicas, este elemento se encuentra presente en el evento 40-3-2 por lo que nos da un indicio de su posible presencia en las muestras.

En la Figura 21 se observan bandas con el tamaño esperado para el control positivo (carril 10) y para las muestras 1, 5, 6, 8, 9 y 18. Las primeras cuatro, corresponden a hamburguesas de carne que habían dado positivo para el gen endógeno de soja; mientras que la muestra 9 corresponde a una milanesa de soja proveniente de Argentina y la muestra 18 a una hamburguesa de soja proveniente del mercado local. Dado que ambos países, se encuentran entre los principales productores mundiales de transgénicos, los resultados coinciden con lo esperado.

Al igual que el control negativo, que valida los resultados, las muestras 7, 3 y 15 (carriles 5, 7, y 14 respectivamente) no presentan banda del tamaño esperado. La muestras 3 es una hamburguesa de soja certificada no transgénica por lo efectivamente los resultados obtenidos hasta el momento coinciden con lo especificado. La muestra 7, que es una hamburguesa de carne en la cual habíamos comprobado la presencia de soja; al igual que la muestra 15, que corresponde a un pancho de soja, si bien contienen *Glycine max*, dan negativo para este rastreo de transgénicos. Dado que ninguno de los dos productos esta certificado como no transgénicos estos hallazgos resultan novedosos ya que ambas muestras provienen del mercado Uruguayo, y como hemos señalado prácticamente toda la soja cultivada en este país esta genéticamente modificada. Así, es posible que la materia prima para su elaboración haya sido importada. De otro modo, siendo cultivada en Uruguay; o bien pertenece a alguno de los eventos transgénicos de soja que no contienen el elemento *t-nos*, o bien es parte del reducido grupo de cultivos no transgénicos.

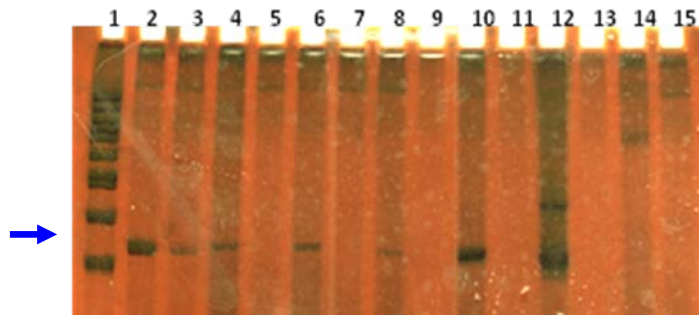


Figura 21: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación obtenidos con los cebadores HA-nos 118F y HA-nos 118 R. **Carril 1:** MPM 50 pb; **Carril 2:** muestra 1; **Carril 3:** muestra 5; **Carril 4:** muestra 6; **Carril 5:** muestra 7; **Carril 6:** muestra 8; **Carril 7:** muestra 3; **Carril 8:** muestra 9; **Carril 9:** Control negativo (sin ADN); **Carril 10:** Control positivo (ADN extraído de soja *RR*); **Carril 11:** vacío; **Carril 12:** muestra 18; **Carril 13:** vacío; **Carril 14:** muestra 15; **Carril 15:** vacío.

En la figura 22 se muestran los resultados para el resto de las muestras elaboradas en base a proteína de soja. Al igual que el control con el evento de soja *RR*, la muestra 10 da positivo para la presencia de *t-nos*. Esta muestra corresponde a una hamburguesa de soja que declara en su envase “certificada no transgénica” por lo que el resultado no coincide con lo declarado.

Para las muestras 11, 12 y 16 se observan bandas más tenues que se clasificaron como resultados dudosos y se volvieron a amplificar, dando sistemáticamente los mismos resultados con bandas de baja intensidad. En este momento, cabe destacar que de entre la gran cantidad de cebadores descritos para detectar *t-nos* (14 pares de cebadores disponibles en la GMDD) decidimos utilizar el par HA-nos 118F-R, diseñado por Lipp. et al. (Lipp, M et al.; 2001) debido a que, no solo están validados por la UE (contenida en el JRC), sino que también constituyen un método de análisis extremadamente robusto (con un 100% de especificidad, 97% de sensibilidad, 2% de falsos negativos y 0% falsos positivos). Así, considerando la sensibilidad de este método y el porcentaje de falsos positivos, y teniendo en cuenta que las tres muestras que dan resultados dudosos coinciden con aquellos productos que estaban cocidos o altamente procesados (tabla 1 marcados en verde) reclasificamos estas muestras como positivas. Dado que las tres se obtuvieron de restaurantes, no contamos con envases que contengan lista de ingredientes, ni declaración alguna acerca de su origen.

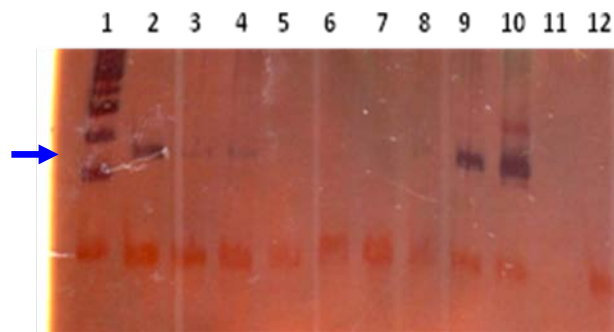


Figura 22: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación obtenidos con los cebadores HA-nos 118F y HA-nos 118 R. **Carril 1:** MPM 50 pb; **Carril 2:** muestra 10; **Carril 3:** muestra 11; **Carril 4:** muestra 12; **Carril 5:** muestra 13; **Carril 6:** muestra 14; **Carril 7:** muestra 15; **Carril 8:** muestra 16; **Carril 9:** Control positivo (ADN extraído de soja RR); **Carril 10:** muestra 18; **Carril 11:** vacío; **Carril 12:** Control negativo (sin ADN).

Finalmente, se obtuvieron resultados negativos para el control sin ADN, que valida los resultados obtenidos, y para las muestras 13 y 14. Estas muestras corresponden a hamburguesas de carne que habían dado negativo para la presencia de la especie *Glycine max*, y se analizaron para corroborar el resultado. Así, el resultado fue el esperado. Sin embargo, cabe mencionar que para estas muestras, y para todas aquellas donde no se observan bandas del tamaño esperado, puede darse el caso que el elemento regulador *t-nos* simplemente no esté presente porque no está dentro de la construcción del transgénico. Es decir, si bien este elemento es común a muchos eventos, no está presente en todos ellos. Además la ausencia de soja, no implica la total ausencia de elementos transgénicos. Si bien es poco probable, y no fue analizado, podría darse el caso que alguna de estas muestras contenga transgénicos de una especie distinta a *Glycine max*, por ejemplo *Zea mays*.

9.2.5.2 Rastreo del promotor 35 S:

Con el objetivo de verificar los resultados del rastreo anterior, y para poder detectar la presencia de eventos transgénicos que no contengan el terminador *t-nos* pero sí el promotor *P-35S* del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV); se llevó a cabo otro método de *screening* con el par de cebadores 35S1- 35S2, (diseñados por Pietsch *et al.*), que amplifican un fragmento de 195 pb.

En las imágenes 24 y 25 se observan los geles de poliacrilamida con los resultados de este rastreo. Para las muestras 1, 5, 6, 9, 10, 11, 12, y control positivo del gel de la figura

23 se pueden ver bandas a la altura del tamaño esperado, lo que implica la presencia en las mismas de ADN con el promotor *P-35S*. Lo mismo se observa para el control positivo y para las muestras 18 y 8 de la figura 24. En el resto de las muestras, al igual que en los controles negativos no aparecen bandas de gran intensidad a la altura esperada.



Figura 23: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación obtenido con los cebadores 35S1 y 35S2. **Carril 1:** MPM 50 pb; **Carril 2:** muestra 9; **Carril 3:** muestra 10; **Carril 4:** muestra 11; **Carril 5:** muestra 12; **Carril 6:** muestra 13; **Carril 7:** muestra 15; **Carril 8:** muestra 1; **Carril 9:** muestra 5; **Carril 10:** muestra 6; **Carril 11:** muestra 7 **Carril 12:** Control positivo (ADN extraído de Soja RR); **Carril 13:** Control negativo (sin ADN).

Las muestras 11, 12 y 16 por el método de rastreo de *t-nos* habían dado bandas de baja intensidad. Por este nuevo método se obtienen bandas más intensas para las primeras dos muestras; mientras que para la muestra 16 se observa un *smear* a lo largo de todo el carril, que es clasificado como un resultado negativo. Para las muestras 7 y 15, que en el método anterior habían dado negativo; aquí se observan resultados dudosos, es decir bandas cuya intensidad es intermedia entre la del control positivo y negativo; esto podría corresponder a la presencia de pequeñas cantidades de eventos transgénicos con este elemento, o a resultados falsos positivos. Mientras que para las muestras 3 y 10, ambas de soja certificada no transgénica, los resultados coinciden entre ambos métodos de rastreo; son negativos para la muestra 3 que concuerda con lo que especifica y positivos para la muestra 10, que parece ser un caso de fraude alimentario.

Es de destacar que, en todas las corridas electroforéticas se observa la presencia de una gran cantidad de bandas inespecíficas, que creemos se debe a una combinación entre cebadores cortos (que por tanto tienen pocas bases para hibridar) y a las diferencias entre las T_m de los cebadores (al usar una temperatura intermedia entre ambos, baja la especificidad de hibridación). Además, los resultados para este método, tampoco fueron

reproducibles. De hecho el método de rastreo en general resultó bastante problemático, dando solo en ocasiones resultados coincidentes con los del rastreo *t-nos*. Asimismo, fueron varias las oportunidades en que se obtuvieron resultados positivos para muestras que no contenían ni el gen endógeno de soja ni el elemento *t-nos*. Si bien este caso podría darse, y corresponder a eventos GM, por ejemplo a la presencia de un evento de maíz transgénico con el elemento P35S y sin el terminador *t-nos*, dado que estos resultados tampoco fueron reproducibles, el método en si resultó poco confiable. Si bien esta metodología ha sido previamente utilizada como parte de los métodos estándares de la Unión Europea para la identificación de OGMs en alimentos, el par de primers 35S1-35S2 es poco eficiente en la detección del promotor 35S (Lipp et al. 2000).

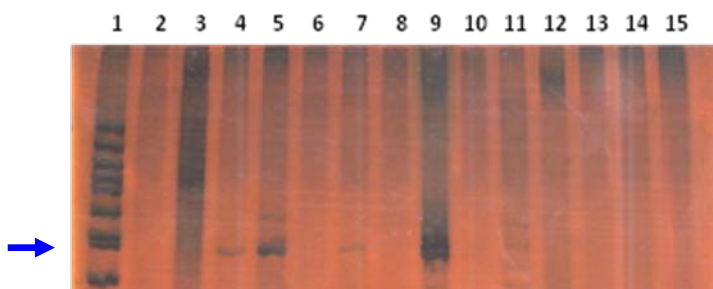


Figura 24: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación obtenido con los cebadores 35S1 y 35S2. **Carril 1:** MPM 50 pb; **Carril 2:** libre; **Carril 3:** muestra 15; **Carril 4:** muestra 16; **Carril 5:** muestra 18; **Carril 6:** libre; **Carril 7:** muestra 8; **Carril 8:** libre; **Carril 9:** positivo (ADN extraído de Soja RR); **Carril 10:** Control negativo (sin ADN); **Carril 11:** muestra 7; **Carril 12:** muestra 4; **Carril 13:** libre; **Carril 14:** muestra 3; **Carril 15:** muestra 2.

9.2.5.3 Identificación del evento GTS 40-3-2:

En Uruguay, el único evento de soja autorizado para cultivo hasta setiembre del 2012 era el GTS 40-3-2 de la empresa Monsanto, mejor conocido como soja *Roundup Ready* o soja *RR*. Dado que las muestras estudiadas en este trabajo, ingresaron al laboratorio en mayo del 2013; en teoría, si la soja que se utilizó para elaborarlos provino de cultivos uruguayos, el único evento que podrían contener es el GTS-40-3-2 de la zafra 2012. Por este motivo, nos propusimos investigar su presencia en las muestras problema.

Con este objetivos, se llevo a cabo la amplificación por PCR utilizando los cebadores 35-soy y CTP4 que, de estar presente el ADN con el que hibridan, generan un amplicón del 74 pb. Si bien este es un método específico de construcción y no de evento, la

probabilidad de que las muestras con resultados positivos para este método y positivos para el terminador *t-nos*, contenga un evento de soja, de entre los autorizados en Uruguay, que no sea GTS-40-3-2 es baja. Aunque podría tratarse de híbridos que tengan como parental este evento, o de cultivos GM provenientes de otros países.

En las figuras 25 y 26 se presentan los resultados de esta amplificación. Como se mencionó, el tamaño esperado para el producto de amplificación es de 74 pb; bandas de este tamaño se observan en la figura 25 para el control positivo (sembrado en el carril 11) y para las muestras 9, 10, 11, 12, 16, y 18. Mientras que en la figura 26 se obtienen resultados positivos para las muestras 1, 5, 8 y control de soja *RR*.

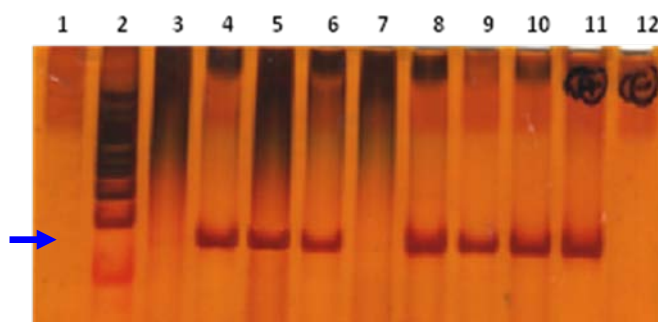


Figura 25: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación obtenidos con los cebadores 35 soy y CTP4. **Carril 1:** libre; **Carril 2:** MPM 50 pb; **Carril 3:** muestra 3; **Carril 4:** muestra 9; **Carril 5:** muestra 10; **Carril 6:** muestra 11; **Carril 7:** muestra 15; **Carril 8:** muestra 12; **Carril 9:** muestra 16; **Carril 10:** muestra 18; **Carril 11:** Control positivo (ADN extraído de soja *RR*); **Carril 12:** Control negativo (sin ADN).

Dado que la construcción de la soja GTS 40-3-2 contiene tanto el terminador *t-nos*, como el promotor 35S, esperábamos que todas las muestras que dieran positivas para este análisis (con 35 soy- CTP4) también hubieran dado positivas para la presencia de soja y para ambos rastreos. Los resultados comprueban que, efectivamente en las muestras 1, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 16, y 18 se obtuvieron resultados positivos no solo para este análisis sino también para el rastreo del terminador *t-nos* y para el gen de la lecitina de soja. La muestra 16, correspondiente a una hamburguesa de soja, fue la única para la cual se obtuvieron resultados positivos en todos los ensayos menos en el *screening* del promotor 35S. Habiendo discutido las limitaciones de este último análisis concluimos que la muestra 16 también presenta ADN de soja *RR*.



Figura 26: Gel de poliacrilamida 12%, teñido con AgNO_3 , sembrado con los productos de la amplificación obtenidos con los cebadores 35 soy y CTP4. **Carril 1:** MPM 50 pb; **Carril 2:** muestra 13; **Carril 3:** libre; **Carril 4:** libre; **Carril 5:** muestra 15; **Carril 6:** muestra 7; **Carril 7:** muestra 8; **Carril 8:** muestra 6; **Carril 9:** muestra 5; **Carril 10:** muestra 1; **Carril 11:** Control negativo (sin ADN); **Carril 12:** Control positivo (ADN extraído de soja RR).

Además, considerando que el evento GTS 40-3-2 es el cultivo de soja más plantado, tanto en nuestro país como en Brasil y Argentina, esperamos que la afirmación inversa también fuera cierta. Es decir que, aquellas muestras que dieron positivo para la presencia de *Glycine max* y para los rastreos, también den en su mayoría positivos para la presencia de este evento. Este fue el caso de las muestras 1, 5, 8, 9, 10, 11, 12, y 18 pero no de la muestra 6, que al parecer es una hamburguesa de carne, que contiene soja, y transgénicos con los elementos *t-nos* y 35S pero que no provienen de la soja RR.

Si bien la muestra 6, al igual que la 13, presenta una sombra a la altura esperada (marcada por la flecha), su intensidad no es suficiente si se la compara con el control o las muestras positivas; así para ambas se reporta un resultado negativo que ha sido confirmado con la repetición del análisis. La muestra 13 es una hamburguesa de carne que también dio negativo para la presencia de soja y para los ensayos de rastreo de transgénicos, por lo que estos resultados concuerdan con lo esperado.

Los controles negativos de ambas figuras, así como las muestras 3, 7 y 15 también dan resultados negativos, con ausencia total de bandas. En estas tres muestras se había detectado presencia del gen endógeno de soja y ausencia del terminador *t-nos*. La muestra 3 también dio negativa para el rastreo de *p-35S* por lo que concluimos que efectivamente se trata de una hamburguesa de soja no transgénica como lo declara su

etiqueta. Las muestras 7 y 15, arrojaron resultados dudosos en el *screening* del promotor 35S. Si estos resultados fueran confirmados como positivos, las muestras podrían contener algún otro evento de soja que contenga el promotor 35S y no el terminador *t-nos*, muy posiblemente el evento A2704-12, producido por la empresa Bayer Crop Sciences y recientemente autorizado en Uruguay (el 19/09/2012). Sin embargo, considerando lo discutido anteriormente para el método de rastreo p35S utilizado, las muestras podrían simplemente no contener transgénicos. Para poder confirmar los resultados habría que analizar estas muestras con otros métodos de rastreo; hasta aquí lo único que se puede asegurar es que no contienen ADN del evento GTS 40-3-2.

Cabe destacar que en los casos de detección de organismos transgénicos hubiera sido ideal contar con otros tipos de controles, por ejemplo un control negativo con ADN de soja no transgénica, y controles certificados para los eventos transgénicos. Sin embargo, la disponibilidad de materiales de referencia para la evaluación de OGMs es actualmente limitada. Debido a cuestiones de patentes y propiedad intelectual, solo unos pocos institutos de investigación tienen materiales de referencia apropiados. Por este motivo, como control positivo se utilizó en todos los casos ADN proveniente del evento de soja 40-3-2 extraído en el laboratorio.

Como se mencionó en la introducción, la cuantificación es un aspecto crucial en el análisis de transgénicos ya que los límites máximos de OGMs en los alimentos son la base del etiquetado en la mayoría de los países que lo implementan. En este sentido la gran desventaja de la PCR convencional es la falta de información cuantitativa. Esto se debe a que para lograr la máxima sensibilidad, las medidas de la cantidad de producto se toman a punto final, una vez que la reacción ha pasado la fase exponencial y alguno de los reactivos se encuentra en cantidades limitantes. En esta fase la correlación entre la concentración del producto y el número inicial de moléculas blanco es muy pobre ya que la eficiencia de la amplificación no se mantiene constante entre ciclos por lo que la concentración de ADN deja de ser proporcional a la cantidad inicial de ADN a amplificar.

9.4 Resultados Finales

En la tabla 7 se resumen de los resultados obtenidos para los análisis de especies animales, vegetales y transgénicos. Con la estrategia diseñada por Matsunaga *et. al.* se detectó la presencia de la especie *Bos taurus* en las muestras de hamburguesas de carne vacuna y su ausencia en las muestras basadas en proteína de soja.

Para confirmar estos resultados se utilizó el método descrito por Bravi *et al.*. Con la PCR utilizando cebadores universales y posterior digestión con *AluI*, efectivamente se comprobó que las muestras de hamburguesa de carne 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8 contienen la especie *Bos taurus*. También se analizó una muestra de hamburguesa de soja (muestra 3) y se comprobó que no estaba contaminada con carne de ganado vacuno. Así, lo declarado por los comerciantes coincide con los resultados obtenidos.

En cuanto a la detección de la especie *Gallus gallus* se esperaban resultados negativos para todas las muestras; no obstante el método de Matsunaga detectó esta especie en la muestra 5, correspondiente a una hamburguesa de carne de ganado vacuno adquirida sin envasar en un comercio de la zona. Dado que la digestión con la enzima de restricción *HinfI* no funcionó correctamente, estos resultados fueron verificados por secuenciación.

En la tabla 7 se puede observar que de las 10 muestras de hamburguesas de carne analizadas, la mitad (muestras 1, 5, 6, 7 y 8) contienen proteína de soja. De estas cinco muestras positivas para la presencia de *Glycine max*, cuatro (1, 6, 7 y 8) declaran contener proteína de soja o proteína vegetal y para la 5 no hay información disponible, ya que se vende como hamburguesa de carne suelta pero no se proporciona un empaque con lista de ingredientes. Así, en ningún caso se observan diferencias entre lo declarado por los comerciantes y lo encontrado en este estudio. De hecho, para las hamburguesas que declaran ser 100% de carne vacuna, en los análisis no hemos encontrado soja, u otra especie animal que no sea *Bos taurus*. Todas las muestras basadas en pasta de soja (3, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 18) contienen la especie *Glycine max*. No se investigó la presencia de otras especies vegetales.

Todos los ensayos de transgénesis dieron negativos para las muestras que no contienen

Muestra #	Tipo de producto	Especies animales		Especies animales		Especies vegetales		Transgenicidad		Rastreo tNdno	Rastreo pNd35S	GTS 40-3-2
		declaradas	encontradas	declaradas	encontradas	declaradas	encontradas	Gen	eNdogeno			
1	Hamburguesa de carne	vaca	vaca	proteína vegetal...	soja	+	+	+	+	+	+	+
2	Hamburguesa de carne	vaca	vaca	ninguna	ninguna	-	-	-	-	-	-	Nd
3	Milanesa de soja	ninguna	ninguna	soja certificada no transgénica	soja	+	-	+	-	-	-	-
4	Hamburguesa de carne	s/declaración	vaca	s/declaración	ninguna	-	-	-	-	-	-	Nd
5	Hamburguesa de carne	vaca	vaca y pollo	ninguna	soja	+	+	+	+	+	+	+
6	Hamburguesa de carne	vaca	vaca	proteína de soja...	soja	+	+	+	+	+	+	-
7	Hamburguesa de carne	vaca	vaca	proteína de soja...	soja	+	-	+	??	??	??	-
8	Hamburguesa de carne	vaca	vaca	proteína de soja...	soja	+	+	+	+	+	+	+
9	Milanesa de soja	ninguna	ninguna	soja...	soja	+	+	+	+	+	+	+
10	Hamburguesa de soja	ninguna	ninguna	soja certificada no transgénica	soja	+	+	+	+	+	+	+
11	Milanesa de soja	s/declaración	ninguna	s/declaración	soja	+	+	+	+	+	+	+
12	Tofu	s/declaración	ninguna	s/declaración	soja	+	+	+	+	+	+	+
13	Hamburguesa de carne	vaca	vaca	ninguna	ninguna	-	-	-	-	-	-	-
14	Hamburguesa de carne	vaca	vaca	ninguna	ninguna	-	-	-	-	Nd	Nd	Nd
15	Pancho de soja	ninguna	ninguna	proteína de soja...	soja	+	-	+	??	??	??	-
16	Hamburguesa de soja	s/declaración	ninguna	s/declaración	soja	+	+	+	+	-	-	+
17	Hamburguesa de carne	vaca	vaca	ninguna	ninguna	-	-	-	-	Nd	Nd	Nd
18	Hamburguesa de soja	ninguna	ninguna	Proteína de soja	soja	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 7: Resumen de los resultados obtenidos para los análisis de especies animales vegetales y transgénicos. Se comparan los resultados encontrados con lo declarado para cada muestra. En la columna 7 se resumen los resultados para el análisis del gen endógeno de *Glycine max*: el gen que codifica para la Lecitina de soja. En la columna 8 los resultados para el rastreo del terminador *t-nos*, en la columna 9 para el *screening* del promotor 35S y en la columna 10 para la presencia de la construcción contenida en el evento GTS 40-3-2. En estas cuatro columnas se utilizaron los símbolos: (+): presencia de la secuencia blanco (resultados positivos); (-): ausencia de secuencia blanco (resultados negativos); (??): resultados dudosos; (Nd): no determinado (análisis no llevados a cabo).

soja (muestras de hamburguesa de carne 2, 4, 13, 14, y 17), lo que en principio concuerda con la hipótesis de que *Glycine max* es la única especie vegetal transgénica presente en este tipo de alimentos. La muestra 3, si bien contiene soja, también dio negativa para todos los ensayos de transgénesis, esto coincide con lo declarado en su etiqueta: hamburguesa de soja certificada no transgénica. Para las muestras 7 y 15 se obtuvieron resultados similares, con presencia de soja y ausencia del terminador *t-nos* y de la construcción GTS 40-3-2. Sin embargo, ambas muestras arrojan resultados dudosos en el rastreo del promotor 35S. Así, estas muestras podrían o no ser transgénicas. En caso de serlo, contienen un evento distinto a la soja RR, que en su construcción tiene el elemento *p-35S* y no el *t-nos*.

Además, las muestras 1, 5, 8, 9, 10, 11, 12, y 18 que amplificaron la construcción del evento GTS 40-3-2 también dieron resultados positivos para los dos rastreos de transgénicos. En los casos en que se dispone de declaraciones o etiquetas, los resultados concuerdan con la información provista (ya que no hay obligación de etiquetado en nuestro país), a excepción de la muestra 10, que en su etiqueta declara: "hamburguesa de soja certificada no transgénica". Dados los resultados obtenidos para esta muestra, estaríamos ante un caso de fraude alimentario.

La muestra 16, correspondiente a una hamburguesa de soja, fue la única para la cual se obtuvieron resultados positivos en todos los ensayos menos en el *screening* del promotor 35S. Habiendo discutido las limitaciones de este último análisis concluimos que la muestra 16 también presenta ADN de soja RR. Asimismo, se encontró una muestra, de hamburguesa de carne, (la muestra 6) que contienen soja y los elementos regulatorios comunes *p-35S* y *t-nos*. Sin embargo habiendo dado positiva en ambos rastreos no contiene el evento GTS 40-3-2.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS:

En la realización de esta tesis se analizaron un total de 18 muestras de ADN provenientes de diversas matrices: hamburguesas de carne y de soja así como tofu, milanesas y pancho de soja. Estas matrices también fueron diversas en cuanto a su grado de procesamiento previo y/o cocción.

10.1 Extracciones de ADN:

Para extraer el ADN de las muestras, escogimos el método de Dellaporta modificado 1, un método originalmente planteado para extraer ADN de vegetales; que en nuestro laboratorio fue adaptado a todo tipo de matrices alimentarias, agregándole un paso de extracción con cloroformo- alcohol isoamílico (desproteínización de matrices animales). Según se mostró en los resultados, por esta técnica se obtuvo ADN de gran concentración y baja pureza, con cocientes A260/A280 alejados del valor óptimo 1,8. Además, muchas de las muestras no quedaron homogéneas por lo que se intentó optimizar la extracción llevando a cabo las modificaciones introducidas en el método Dellaporta modificado 2. Los cambios en el protocolo de extracción lograron aumentar la homogeneidad (y por lo tanto la representatividad de las muestras y de los resultados). Sin embargo, aún con los cambios implementados, gran parte del ADN extraído queda degradado y su pureza sigue siendo baja.

Varios grupos de investigación como el de Anklam (Anklam et al., 2001) han revisado numerosos métodos para extraer ADN de muestras complejas, tanto crudas como cocidas. De querer optimizar la pureza obtenida en la extracción se podría utilizar alguno de estos métodos revisados por Anklam, o seguir modificando el protocolo de Dellaporta. No obstante, consideramos que los objetivos en cuanto a la obtención de ADN fueron cumplidos porque si bien los ADN extraídos presentan contaminantes, estos no resultan en un inconveniente de importancia para este tipo de análisis. En todos los casos (y para todas las muestras) el ADN extraído sirvió como molde de amplificación y pudo utilizarse de forma directa, sin pasos adicionales de purificación. Además, incluso si las concentraciones de ADN fueron sobreestimadas, se obtuvieron cantidades de ADN en el orden de los mg, y las diluciones 100 ng/μL de estas soluciones lograron amplificar en todos los casos, por lo que el rendimiento del método para la extracción de ADN de estas matrices resulta evidente.

Además, para las matrices más complejas (ej., cocidas o el *tofu*) los resultados fueron muy similares a los que se obtuvieron en aquellas muestras con poco procesamiento. Así, también es destacable el hecho que un mismo método pueda ser utilizado para extraer ADN de tan alta diversidad de matrices. Cuando se analizan muestras tan diversas resulta útil y ahorra mucho tiempo y recursos el poder utilizar un mismo método de extracción de ADN en todas ellas. Más aún, cuando este método resulta ser sustancialmente más económico que los kits comerciales.

Para obtener el control positivo de la especie *Gallus gallus*, se llevó a cabo la extracción de ADN a partir de hígado de pollo con dos métodos de extracción. Como era esperado el método de extracción por *kit* da una pureza muy buena del ADN extraído, pero una concentración baja comparada con el “método de extracción de Dellaporta modificado 1”. Dado que este último método es sustancialmente más económico este resultado aporta una herramienta para en un futuro decidir, mediante un balance costo/beneficio, que método utilizar en una extracción de ADN de pollo.

10.2 Análisis de especies por PCR:

Las estrategias diseñada por Matsunaga *et al.* y Bravi *et al.* para detectar la presencia de *Bos taurus*, funcionaron correctamente. Se obtuvieron resultados concordantes entre ellas y se pudo comprobar que efectivamente esta especie está presente en las muestras de carne de ganado vacuno y ausente en las muestras basadas en proteína de soja. En cuanto a la detección de la especie *Gallus gallus* se esperaban resultados negativos para todas las muestras; no obstante con el método de Matsunaga para la detección de pollo se obtuvieron resultados positivos para la muestra 5, correspondiente a una hamburguesa de carne de ganado vacuno adquirida sin empaquetar en un comercio de la zona. La presencia de pollo en la muestra 5 no pudo ser corroborada por el método de Bravi *et al.* debido a que la enzima de restricción *Hinf* I no funcionó correctamente. Sin embargo, la secuenciación del fragmento de amplificación obtenido con el uso de los cebadores Fsim y Rc permitió comprobar los resultados obtenidos por Matsunaga. Así concluimos que, si bien hace falta investigar por qué el control de reacción cruzada da positivo, la estrategia de Matsunaga resulta eficiente para determinar la presencia de ambas especies animales en ADN provenientes de diversas matrices alimentarias. Esto la hace un método excelente para comprobar o descartar la posible existencia de contaminaciones y/o

fraudes alimentarios, y para asegurar a los consumidores sobre el contenido en especies animales de los alimentos que consumen. El método de Bravi, si bien tiene un límite de detección más alto que el de Matsunaga (Miller, 2010), también demostró ser bueno en la determinación de especies animales.

En vista del gran potencial que tiene la proteína de soja como adulterante de alimentos, y dado que esta proteína vegetal es de las más usadas en la sustitución fraudulenta por proteínas animales (Meza-Marquez, 2010), nos propusimos averiguar si las hamburguesas de carne de los mercados locales contenían soja, y si la misma era transgénica. La mitad de las muestras de hamburguesas de carne analizadas contienen ADN de soja. Si bien este porcentaje nos resulta alto, no está fuera de las normativas. De hecho, a diferencia de países como Brasil, donde se permite un máximo de 7,5 % (peso seco) de proteína en hamburguesas de carne (Macedo-Silva *et. al.*, 2001) Uruguay no establece límites al contenido de soja en hamburguesas. Además no se encontraron discrepancias entre los resultados y lo declarado por los comerciantes, ni para las muestras basadas en carne ni para los alimentos de pasta de soja. Con respecto al método utilizado en la detección, logramos comprobar su efectividad. En todos los casos se obtuvieron resultados, claros y reproducibles.

10.3 Análisis de transgénicos por PCR:

Para analizar la presencia de OGMs se llevaron a cabo dos estrategias de rastreo de elementos comunes presentes en gran cantidad de eventos transgénicos, así como una amplificación que permite detectar la presencia de la construcción GTS 40-3-2.

Si bien el *screening* del terminador *t-nos* presentó mayor especificidad y resultó más confiable que el rastreo del promotor *p-35S*, fue mediante la utilización de ambos métodos que se pudo determinar de modo confiable la presencia o ausencia de ADN de OGMs en todas las muestras analizadas. De las 16 muestras en las que se realizaron ambos ensayos de rastreo, los resultados de solo tres de ellas no dieron coincidentes entre ambas técnicas. Dado que dos de estas tres, no contienen la construcción GTS 40-3-2, es posible que la falta de coincidencia en los resultados se deba a que solo uno de los elementos este presente.

Por su parte, el método para detectar la presencia de la construcción de soja RR también resultó altamente específico. Dado que este evento es el cultivo más importante en el mundo (Berdal *et al.*, 2001) y ciertamente el más plantado en nuestro país, esta técnica resulta de gran utilidad. De hecho, permitió comprobar que la mayor parte de las matrices con soja analizadas en este trabajo contienen este evento (9 de las 13 muestras que contienen soja, pertenecen al evento GTS 40-3-2).

También nos parece importante destacar las limitaciones en la metodología utilizada. Para muestras como la 3, el que todos los análisis de transgenicidad aquí realizados hayan dado negativo, no descarta completamente la posibilidad de que estén presentes otros eventos de soja; por ejemplo, el evento MON-89788 que no contiene el promotor 35S ni el terminador NOS (Barbau-Piednoir *et al.*, 2010). James (2010) menciona que existen 14 eventos de *Glicine max* aprobados en distintos países; así, para asegurar que una muestra cualquiera no contiene soja transgénica hay que descartar la presencia de al menos un elemento de la construcción de cada evento o apilado.

La PCR a punto final constituye un análisis cualitativo, es decir, donde el resultado de amplificación da positivo o negativo, (presencia o ausencia de OGMs). En Uruguay no existían normativas con umbrales establecidos para el contenido de OGMs, pero actualmente se está reglamentando un decreto de la Junta Departamental de Montevideo que establece la obligatoriedad del etiquetado para aquellos alimentos que contienen ingredientes que superan el 1% en contenido total de transgénicos. Así, surge en el país una necesidad imperiosa de estandarizar metodologías cuantitativas para el análisis de transgénicos. En este sentido, de las técnicas disponibles, la opción más viable es la utilización de la PCR en tiempo real. Dado que para la cuantificación por PCR en tiempo real, el tamaño de los amplicones recomendables está dentro del rango 70-200 pb (Berdal & Holst-Jensen; 2001); se podría poner a punto la técnica con varios de los cebadores utilizados en este trabajo para PCR a tiempo final. Sin perjuicio de ello, existen disponibles en las bases de datos, varios métodos validados por la UE que permiten la cuantificación por PCR en tiempo real.

En conclusión, creemos que los resultados obtenidos han logrado demostrar la capacidad que tienen estos métodos moleculares de analizar diversas matrices alimentarias en cuanto a su composición de especies animales, vegetales y

transgénicos. Permiten detectar casos de fraude alimentario y malas prácticas de manufactura. Así, el trabajo realizado tiene una aplicación directa en la defensa de los derechos de los consumidores y permite dotar a los organismos de contralor con herramientas moleculares capaces de autentificar la calidad de los productos alimenticios. En la actualidad el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria (LaTraMa) de Facultad de Ciencias, tiene un convenio de transferencia tecnológica con el laboratorio de Bromatología de la IMM, mediante el cual se están aplicando estos métodos para garantizar la seguridad alimentaria y buenas prácticas de manufactura a nivel de los alimentos que consume la población de Montevideo.

BIBLIOGRAFIA:

Aarts, H. J. M., Rie, J.-P. P. F. V., & Kok, E. J. (2002). Traceability of genetically modified organisms. *Expert Review of Molecular Diagnostics*; **2**: 69-76.

Ahmed, F.E (2002). Detection of genetically modified organisms in food. *Trends in Biotechnology*; **20**: 215-223.

áJohn Dennis, M. (1998). Recent developments in food authentication. *Analyst*, **123**: 151-156.

Akiyama, H., Watanabe, T., Wakabayashi, K., Nakede, S., Yasui, S., Sakata, K., *et al.* (2005). Quantitative detection system for maize sample containing combined-trait genetically modified maize. *Analytical Chemistry*; **77**: 7421-7428.

Anklam. E, Gadani. F, Heinze. P, Pijnenburg. H, Den Eede. GV. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur Food Res Techno;l* **214**: 3-26.

Anon (1996). MAFF UK. Labelling of fresh meat and poultry survey. *Food Surveillance Information Sheet* (pp. 87)
disponible en <http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1996/no87/87frozen.htm>

Anon (2001). Kantonaler Vollzug der Lebensmittelgesetzgebung—Exécution de la législation sur les denrées alimentaires par les cantons. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **92**: 390–480.

Arbeletche P, Carballo C. (2006). Sojizacion y concentracion de la agricultura urguaya, Trabajo presentado al XXXIV Congreso de la Asociacion Aregentina de Economia Agricola, Cordoba, Argentina 2006.

Arleo, M., Ruibal, F., Pereyra, J., Miquel, E., Fernández, M. and Martínez, C. (2012): A DNA-based approach to discriminate between quince and apple in quince jams. *International Food Research Journal*. **19**: 1471-1477

Ayaz, Y., Ayaz, N.D., & Erol, I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Muscle Foods*, **17**: 214-220.

Ballin, N. Z., Vogensen, F. K., & Karlsson, A. H. (2009). Species determination—Can we detect and quantify meat adulteration?. *Meat Science*, **83**: 165-174.

Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, **86**: 577-587.

Barai, B. K., Nayak, R. R., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (1992). Approaches to the detection of meat adulteration. *Trends in Food Science & Technology*, **3**, 69-72.

Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Mbongolo-Mbella, G., Roosens, N., Sneyers, M., Leunda-Casi, A., & Van den Bulcke, M. (2010). SYBR® Green qPCR *screening* methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products. *European Food Research and Technology*, **230**: 383-393.

Berdal, K. G., & Holst-Jensen, A. (2001). Roundup Ready® soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *European Food Research and Technology*, **213**: 432-438.

Bravi, C. M., Lirón, J. P., Mirol, P. M., Ripoli, M. V., Peral-García, P., & Giovambattista, G. (2004). A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. *Legal Medicine*, **6**: 246-251.

Brett, G. M., Chambers, S. J., Huang, L., & Morgan, M. R. A. (1999). Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control*, **10**:401-406.

Bruderer, S.; Leitner, K. E. (2003) Genetically modified (GM) crops: molecular and regulatory details. Version 2. BATS, Centre for Biosafety Assessment, Technology and Sustainability.
disponible en: <http://www.bats.ch/gmo-watch/GVO-report140703.pdf>

Carter, C. A., & Gruère, G. P. (2003). Mandatory labeling of genetically modified foods: does it really provide consumer choice?. *AgBioForum*, **6**: 68-70.

Castro, F.,García,M.C., Rodríguez, R.,Rodríguez, J.,&Marina, M.L. (2007). Determination of soybean proteins in commercial heat-processed meat products prepared with chicken, beef or complex *mixtures* of meats from different species. *Food Chemistry*,**100**, 468–476.

Chaouachi, M., Chupeau, G., Berard, A., McKhann, H., Romaniuk, M., Giancola, S., *et al.* (2008). A high-throughput multiplex method adapted for GMO detection. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **56**: 11596-11606.

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*, **56**: 295-299.

Chou, C. C., Lin, S. P., Lee, K. M., Hsu, C. T., Vickroy, T. W., & Zen, J. M. (2007). Fast differentiation of meats from fifteen animal species by liquid chromatography with electrochemical detection using copper nanoparticle plated electrodes. *Journal of Chromatography B*, **846**: 230–239.

Dean, N., Murphy, T. B., & Downey, G. (2006). Using unlabelled data to update classification rules with applications in food authenticity studies. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, **55**: 1-14.

Demeke, T., & Ratnayaka, I. (2008). Multiplex qualitative PCR assay for identification of genetically modified canola events and realtime event-specific PCR assay for quantification of the GT73 canola event. *Food Control*, **19**: 893-897.

Dong, W., Yang, L., Shen, K., Kim, B., Kleter, G. A., Marvin, H. J. P., *et al.* (2008). GMDD: a database of GMO detection methods. *BMC Bioinformatics*, **9**: 260.

Edelmann, A., Diewok, J., Schuster, K. C., & Lendl, B. (2001). Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 1139-1145.

Elenis, D. S., Kalogianni, D. P., Glynou, K., Ioannou, P. C., & Christopoulos, T. K. (2008). Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **392**: 347-354

European Commission, Existing rules on GM food & animal feed disponible en http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation/gm_food_animal_feed_en.htm

European Union Reference laboratory for GM food and feed. (2011). Compendium of reference methods for GMO analysis. JRC referent report; disponible en http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/pcr/GMO-JRC_Reference%20Report_2011.pdf

Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E. & Martín, R. (2007). Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*). Using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat science*, **76**: 234-240.

Ferber, D. (1999). GM crops in the cross hairs. *Science*, **286**: 1662-1666.

Flores-Munguia, M. E., Bermudez-Almada, M. C., & Vázquez-Moreno, L. (2000). A research note: Detection of adulteration in processed traditional meat products. *Journal of Muscle Foods*, **11**: 319-325.

Foucard, T., & Malmheden Yman, I. (1999). A study on severe food reactions in Sweden—is soy protein an underestimated cause of food anaphylaxis?. *Allergy*, **54**: 261-265.

Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Shivakumar, B. M., Anand, M., Patel, M., & Sharma, B. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat science*, **70**: 107-112.

GMOMETHODS: EU Database of Reference Methods for GMO Analysis (2012); disponible en <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>

Gonzalez-Cordova, A. F., Calderon de la Barca, A. M., Cota, M., & Vallejo-Cordoba,

B. (1998). Detección inmunoquímica de la adulteración de chorizo de cerdo con proteínas de soja: Immunochemical detection of fraudulent adulteration of pork chorizo (sausage) with soy protein. *Food Science and Technology International*, **4**: 257–262.

Grohmann, L., Brühnen-Nieweler, C., Nemeth, A., & Waiblinger, H. U. (2009). Collaborative trial validation studies of real-time PCR-based GMO screening methods for detection of the bar gene and the ctp2-cp4epsps construct. *Journal of agricultural and food chemistry*, **57**: 8913-8920.

Gruère, G. P., & Rao, S. R. (2007). A review of international labeling policies of genetically modified food to evaluate India's proposed rule. *AgBioForum*, **10**: 51-64.

Grunert, K. G., Bredahl, L., & Brunsø, K. (2004). Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector—a review. *Meat Science*, **66**: 259-272.

Haider, N., Nabulsi, I., & Al-Safadi, B. (2012). Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial *COI* gene. *Meat science*, **90**: 490-493.

Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **270**: 313-321.

Hernández, A. et al. (2001): "Encuesta sobre el uso de soja transgénica en el Uruguay" Departamento de CCSS. Facultad de Agronomía. UDELAR, Montevideo.

Holst-Jensen A., Ronning S., Lovseth A. & Berdal K. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **375**: 985-993.

Hsieh, Y. H. P., Woodward, B. B., & Ho, S. H. (1995). Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays. *Journal of Food Protection*, **58**: 555-559.

Hurst, CD, Knight, A, Bruce, IJ, (1999) "PCR detection of genetically soya and maize in foodstuffs". *Molecular Breeding*, **5**: 579-586.

Ilhak, O. I., & Arslan, A. (2009). Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **31**: 159-163.

James C (2012) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. Ithaca, New York: ISAAA.

Klintman, M. (2002). The Genetically Modified (GM) Food Labelling Controversy Ideological and Epistemic Crossovers. *Social studies of science*, **32**: 71-91.

Koppelman, S. J., Lakemond, C. M., Vlooswijk, R., & Hefle, S. L. (2004). Detection of soy proteins in processed foods: Literature overview and new experimental work. *Journal of AOAC International*, **87**: 1398–1407.

Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G., & Anklam, E. (2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research and Technology*, **212**: 497-504.

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

Lüthy, J. (1999). Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. *Food control*, **10**: 359-361.

Macedo-Silva, A., Barbosa, S. F. C., Alkmin, M. G. A., Vaz, A. J., Shimokomaki, M., & Tenuta-Filho, A. (2000). Hamburger meat identification by dot-ELISA. *Meat science*, **56**: 189-192.

Macedo-Silva, A., Shimokomaki, M., Vaz, A. J., Yamamoto, Y. Y., & Tenuta-Filho, A. (2001). Textured soy protein quantification in commercial hamburger. *Journal of Food Composition and Analysis*, **14**: 469–478.

Mannion, A. and Morse, S (2013). GM crops 1996-2012: a review of agronomic, environmental and socio-economic impacts. University of Surrey, Centre for Environmental Strategy Working Paper 04/13.

Marchant, G. E., Cardineau, G. A., & Redick, T. P. (Eds.). (2010). Thwarting Consumer Choice: The Case Against Mandatory Labeling for Genetically Modified Foods. AEI Press.

Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J & Shinmura Y, (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science* **51**: 143-148.

Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., *et al.* (2000). A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. **41**: 137-143.

Mazzara, Marco, Claudia Paoletti, Philippe Corbisier, Emanuele Grazioli, Sara Larcher, Gilbert Berben, Marc De Loose *et al.* (2013). "Kernel Lot Distribution Assessment (KeLDA): a Comparative Study of Protein and DNA-Based Detection Methods for GMO Testing." *Food Analytical Methods*. **6**: 210-220.

Meza-Márquez, O. G., Gallardo-Velázquez, T., & Osorio-Revilla, G. (2010). Application of mid-infrared spectroscopy with multivariate analysis and soft independent modeling of class analogies (SIMCA) for the detection of adulterants in minced beef. *Meat science*. **86**: 511-519.

Miller, A. (2010) Estudio de métodos moleculares para detección de adulteraciones de Quesos de Cabra con leche de Vaca. Tesis de Grado de Lic.Bioquímica, Facultad de Ciencias UDELAR.

Muldoon, M. T., Onisk, D. V., Brown, M. C., & Stave, J. W. (2004). Targets and methods for the detection of processed animal proteins in animal feedstuffs. *International Journal of Food Science and Technology*. **39**: 851–861.

Nikolic, Z., Taski-Ajdukovic, K., Jevtic, A., & Marinkovic, D. (2009). Detection of GM soybean in food products by simultaneous employment of three pairs of PCR primers. *Food Research International*. **42**: 349-352.

Popping, B. (2001). Methods for the detection of genetically modified organisms: precision, pitfalls and proficiency. *American Laboratory*, **33**:70-80.

Prakash, A., & Kollman, K. L. (2003). Biopolitics in the EU and the US: A Race to the Bottom or Convergence to the Top?. *International Studies Quarterly*, **47**: 617-641.

Proyecto DINAMA-PNUMA-FMAM (2007) Propuesta de Marco Nacional de Bioseguridad para Uruguay. URU-04-009 Informe final, disponible en: <http://www.inase.org.uy/files/docs/A1FCC115AF97052C.pdf>

Rehbein, H., Mackie, I. M., Pryde, S., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Perez-Martin, R., ... & Rey-Mendez, M. (1999). Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food chemistry*, **64**: 263-268.

Reglamento Bromatológico Nacional, 4ª Edición, Decretos Nº 315/994 (1994) y 105/001 (2001) pp.165, 379. (Diario Oficial)

Rønning SB, Vaitilingom M, Berdal KG, Holst-Jensen A (2003) *Eur Food Res Technology*. **86**: 953-957.

Saez, R., Sanz, Y., & Toldra, F. (2004). PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science*, **66**: 659–665.

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

Shrestha, Hari K., Kae-Kang Hwu, and Men-Chi Chang, (2010). "Advances in detection of genetically engineered crops by multiplex polymerase chain reaction methods." *Trends in Food Science & Technology*, **21**: 442-454.

Silvestre, M. H. (1995). La calidad de carnes frescas picadas de bovino, ovino, porcino y similares. *Alimentaria*. **33**: 83-85.

Spychaj, A., Mozdziak, P. E., & Pospiech, E. (2009). PCR methods in meat species identification as a tool for the verification of regional and traditional meat products. *Acta Scientiarum Polonorum: Technologia Alimentaria*, **8**: 80.

Stave, J. (2002). Protein immunoassays methods for detection of biotech crops: applications, limitations and practical consideration. *Journal of AOAC International*, **85**: 780-786.

Sumar, S., & Ismail, H. (1995). Adulteration of foods—past and present. *Nutrition & Food Science*, **95**: 11-15.

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

Tozzini, A. C., Martínez, M., Lucca, M. F., Vázquez Rovere, C., Distéfano, A. J., del Vas, M., & Hopp, E. (2000). Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification. *Electronic Journal of Biotechnology*. **3**: 25-34.

Van de Bulcke, M., Schrijver, A. D., De Bernardi, D., Davos, Y., MbongoMbella, G., Casi, A. L., *et al.* (2007). Detection of genetically modified plant products by protein strip testing: an evaluation of real life samples. *European Food Research & Technology*. **225**: 49-57.

Van den Eede, GL, Lipp, M., Eyquem, F., & Anlkam, E. (2000) Validation of a Double Competitive Polymerase Chain Reaction Method for the Quantification of GMOs in Raw Materials, European Commission, Joint Research Centre, IHCP, Ispra, Italy, EUR 19676209, 77–82.

Windels P, Taverniers I, Depicker A, Van Bockstaele E, De Loose M (2001) *European Food Research & Technology*. **213**:107–112.

Woolfe, M., & Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, **22**: 222-226.

Yang, L., Guo, J., Pan, A., Zhang, H., Zhang, K., Wang, Z., & Zhang, D. (2007). Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maize using one novel standard reference molecules. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **55**: 160-162

Yman, I. M., Eriksson, A., Everitt, G., Yman, L., & Karlsson, T. (1994). Analysis of food proteins for verification of contamination or mislabelling. *Food and Agricultural Immunology*. **6**: 167-172.

APÉNDICE:

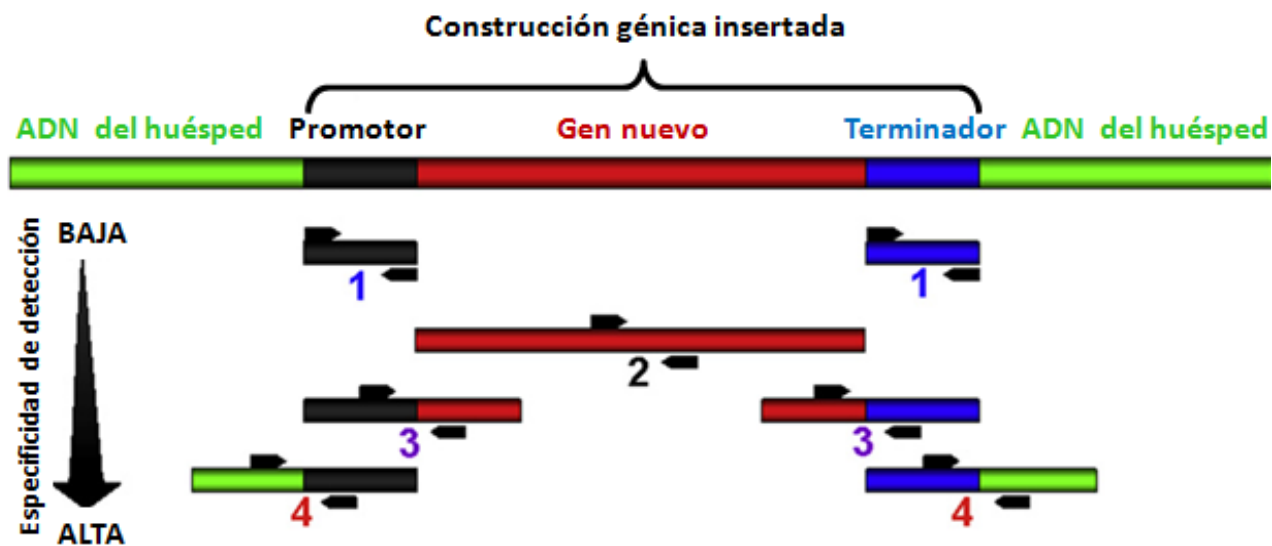


Figura 1: Cuatro estrategias principales de PCR adaptado de Shrestha, Hari K., Kae-Kang Hwu, and Men-Chi Chang. "Advances in detection of genetically engineered crops by multiplex polymerase chain reaction methods." *Trends in Food Science & Technology* 21.9 (2010): 442-454.

Rank	Country	Area (10 ⁶ ha)	Biotech Crops
1*	USA*	69.5	Soybean, maize, cotton, canola, squash, papaya, alfalfa, sugarbeet
2*	Brazil*	36.6	Soybean, maize, cotton
3*	Argentina*	23.9	Soybean, maize, cotton
4*	Canada*	11.6	Canola, maize, soybean, sugar beet
5*	India*	10.8	Cotton
6*	China*	4.0	Cotton, tomato, poplar, petunia, papaya, sweet pepper
7*	Paraguay*	3.4	Soybean, maize, cotton
8*	South Africa	2.9	Cotton, maize, soybean
9*	Pakistan*	2.8	Cotton
10*	Uruguay*	1.4	Soybean, maize
11*	Bolivia*	1.0	Soybean
12*	Philippines	0.8	Maize
13*	Australia*	0.7	Cotton, canola
14*	Burkina Faso	0.3	Cotton
15	Myanmar	0.3	Cotton
16*	Mexico	0.2	Cotton, soybean
17*	Spain	0.1	Maize
18	Chile	<0.1	Maize, soybean, canola
19	Colombia	<0.1	Cotton
20	Honduras	<0.1	Maize
21	Sudan	<0.1	Cotton
22	Portugal	<0.1	Maize
23	Czech Republic	<0.1	Maize
24	Cuba	<0.1	Maize
25	Egypt	<0.1	Maize
26	Costa Rica	<0.1	Cotton, soybean
27	Romania	<0.1	Maize
28	Slovakia	<0.1	Maize

Tabla 1: Área global de cultivos biotecnológicos en 2010. Ranking de países (basado en James, 2012)

* países considerados como principales productores de transgénicos

GM CROP	AREA PLANTED Million ha	Percentage of Global Area
Soybean	73.3	50
Cotton	21.0	14
Maize	46.8	31
Rape (Canola)	7.0	5

Tabla 2: Área plantada de los principales cultivos genéticamente modificados en relación con la producción 2010 (sacado de Mannion & Morse, 2013; basado en James 2010)

Australia	Hungary	Portugal
Austria	Iceland	Romania
Belarus	India	Russia
Belgium	Indonesia	Saudi Arabia
Bolivia	Ireland	Senegal
Bosnia and Herzegovina	Italy	Slovakia
Brazil	Japan	Slovenia
Bulgaria	Jordan	South Africa
Cameroon	Kazakhstan	South Korea
China	Kenya	Spain
Croatia	Latvia	Sri Lanka
Cyprus	Lithuania	Sweden
Czech Republic	Luxembourg	Switzerland
Denmark	Malaysia	Taiwan
Ecuador	Mali	Thailand
El Salvador	Malta	Tunisia
Estonia	Mauritius	Turkey
Ethiopia	Netherlands	Ukraine
Finland	New Zealand	United Kingdom
France	Norway	Vietnam
Germany	Peru	
Greece	Poland	

Tabla 3: Lista de países con etiquetado obligatorio de alimentos genéticamente modificados. Disponible en <http://www.centerforfoodsafety.org/reports/1413/genetically-engineered-food-labeling-laws-map>

Especie/Evento	
Soja 40-3-2 (RR)	Co
Soja A2704-12 (LL)	Co
Soja A5547-127 (LL)	Co
Soja MON89788XMON87701 (RR2YBt)	Co
Soja BPS-CV127-9	Co
Soja DAS44406-6	Co
Soja MON89788XMON87708	Co
Maíz MON810	Co
Maíz BT11	Co
Maíz GA21	Co
Maíz GA21XBT11	Co
Maíz TC1507	Co
Maíz NK603	Co
Maíz MON810XNK603	Co
Maíz TC1507XNK603	Co
Maíz BT11XMON810XNK603	Co

Tabla 4 Solicitudes de OGMs tramitadas a marzo 2013 en Uruguay. Disponible en la página web del MGAP (<http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,1,620,O,S,0,,>)

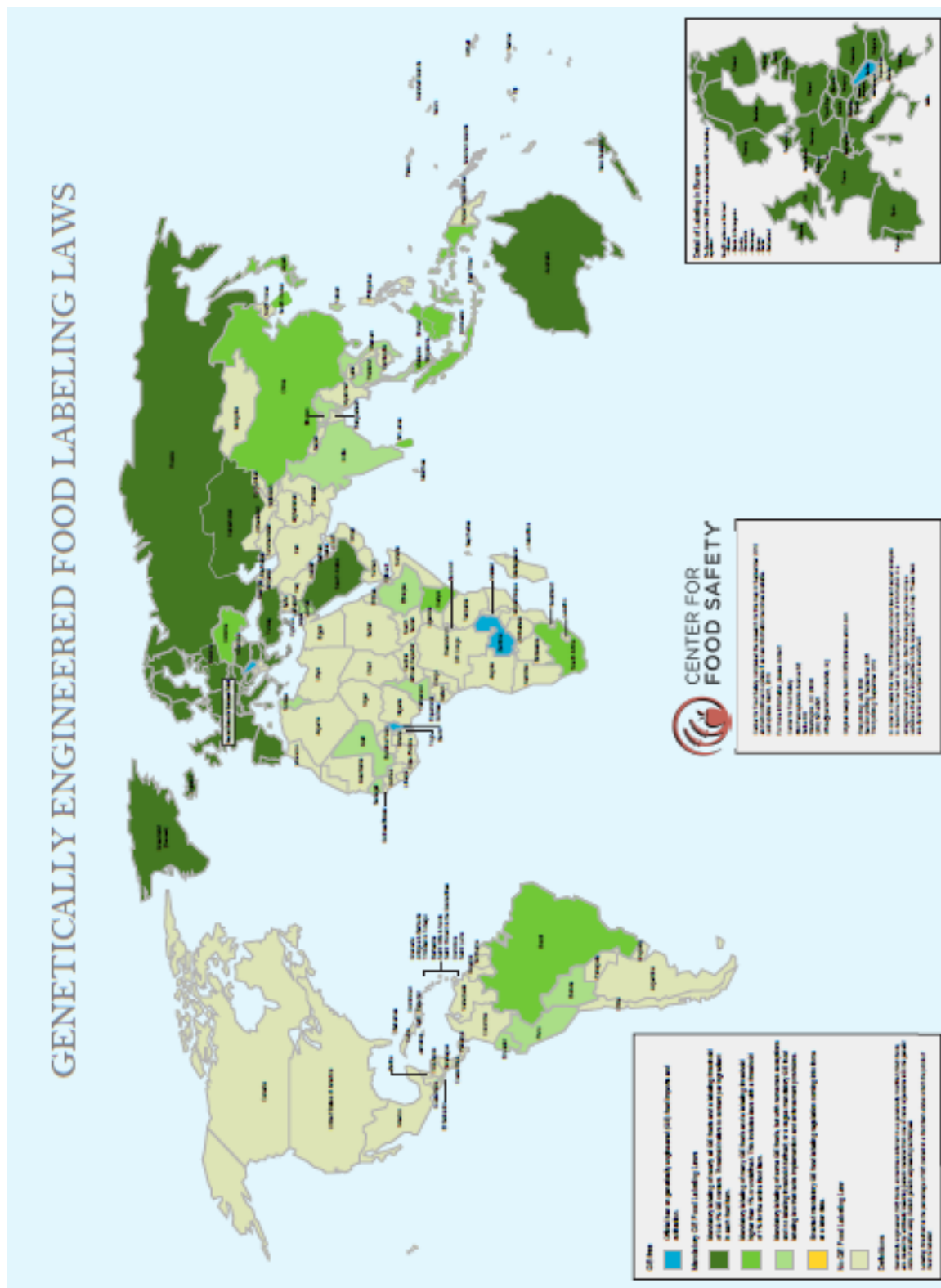


Figura 2: Países que regulan el etiquetado de alimentos genéticamente modificados.
<http://www.centerforfoodsafety.org/reports/1413/genetically-engineered-food-labeling-laws-map>.

Basic Information

Event	GTS 40-3-2
OECD UI	MON-04032-6
Trade Name	Roundup Ready® Soybean
Species	<i>Glycine max</i> (Soybean)
Introduced Trait	Herbicide Tolerant
Transformation Method	Microparticle bombardment
Transformation Vector	PV-GMGT04
Developer	Monsanto Company

Introduced Elements



All Known Sequence:

(1)

ref: | AB209952 || AJ308514 || AJ308515 |

Plant DNA	CaMV 35S	CTP4	Cp4 epsps	nos	Cp4 epsps trunc	unknown	Plant DNA
-----------	----------	------	-----------	-----	-----------------	---------	-----------

+ View Complete Sequence & Detailed Information

```

1 CCCAAGTTC TAAATCTCA AGTTTCTTG TTTTGGATC TAAAAACTG
51 AAAAATTCAG AACCTTGTG AAATTATTCA AACCTTCAA TTAAACCGAT
101 GCTAATGAGT TATTTTGA TGCTTAATT TGTTCTATC AAATGTTAT
151 TTTTTTTTAC TAGAAATAAC TTATTGCATT TCATTCAAAA TAAGATCATA
201 CATACAGGTT AAAATAACA TAGGGAACCC AAATGAAAA GGAAGGTGGC
251 TCCTACAAAT GCCATCATTG CGATAAAGGA AAGGCCATCG TTGAAGATGC
301 CTCTGCCGAC AGTGGTCCA AAGATGGACC CCCACCCACG AGGAGCATCG
351 TGGAAAAAGA AGACGTCCA ACCACGTCTT CAAAGCAAGT GGATTGATGT
401 GATATCTCCA CTGACGTAAG GGATGACGCA CAATCCCACT ATCCTTCGCA
451 AGACCCTTCC TCTATATAAG GAAGTTCATT TCATTGGAG AGGACACGCT

```

Target Gene

cp4 epsps cassette	Promotor :	P-35S-CTP4 enhanced CaMV 35S;chloroplast transit peptide from Petunia hybrida
	Coding Region :	Coding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase From <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	Terminator :	NOS 3' <i>A. tumefaciens</i> nopaline synthase (nos) 3'-polyadenylation signal

Molecular Characterization

As mentioned in the Monsanto's original petition, GTS40-3-2 contains a single insert, containing P-35S, CTP4, cp4 epsps, and T-nos. No other elements are found in the cotton genome.

Additional studies conducted by Monsanto showed that the insert of T-nos is complete. A 250 bp segment of the cp4 epsps, and a 534 bp rearrangement of the DNA are found adjacent to the 3' end of the T-nos. Besides, a 72 bp cp4 epsps inactive fragment is also found in the genome.

Figura 3: Información básica del evento GTS 40-3-2 tal como se ve en la base de datos GMDD (sacado de Dong *et al.*, 2008)

Nucleic Acid - Based Method
For Exogenous Gene:

Strategy	Method Type	Probe Name	Amplicon	Probe Type	Validation Info	Standard
Screening	Qualitative	P355-03 / P355-04	12bp		Yes	ISO
		HA-anti18S / HA-anti18S-I	118bp		Yes	ISO
		HR25.2.5 / HR25.2.3	18 bp			
		35s-1 / 35s-2	165bp		Yes	ISO
		35S22BP1 / 35S12BP2	158bp			
Screening	Qualitative	coat21BP1 / coat21BP2	125bp			
	Quantitative	35S-F / 35S-R	82bp	Touchdown	Yes	ISO/Reference
		35S-F / 4R	79bp	Touchdown		
		P307P / P307R	121bp	Touchdown		
		HA-anti18S / HA-anti18S-I	118bp			
Gene-Specific	Chip	T355_29.L / T355_29.R	134bp			
		non-3_38.L / non-3_38.R	138bp			
		P305_31.L / P305_31.R	188bp			
		anti18S-F / anti18S-R	145bp	Touchdown		
		CABIT / CABIT	84bp			
Candidatus Specific	Qualitative	p35s-12 / p35s-11	168bp		Yes	ISO/Reference
		SPA / SPB	172bp			
		P3205-10 / P3205-11	328bp			
		HR5 01.3 / HR5 01.3	121bp	Touchdown	Yes	Reference
		HR1-F / HR2-R	Upstream	Touchdown		
Chip	Quantitative	HR1-F / HR1-R	74bp	Touchdown		
		41_87.L / 41_87.R	83bp	Touchdown	Yes	ISO
		35s-12 / p35s-11	172bp	Touchdown	Yes	ISO
		p35s-12 / p35s-11	172bp			
		HR2025 For / HR2025 Rev	218bp	1.00r, 1.00r		
Qualitative	Chip	HRM / HRM	188bp			
		41_39.L / 41_39.R	151bp			
		41_40.L / 41_40.R	177bp			
		35S2 / HR3	369bp			

Event-Specific	Quantitative	41_1.L / 41_1.R	84bp	Touchdown	
		HR55-F / HR55-R	85bp	Touchdown	
		41_21.L / 41_21.R	111bp	FRET	
		41_29.L / 41_29.R	178bp	Scorpion	
		35S2 / 4HR3	188bp		
		35S2-JUNC / HR53-JUNC	148bp	Touchdown	
		HR5 5YB 101 F / HR5 5YB 101 H	107bp	SYBR	
				Green	
		HR5 5YB 201 F / HR5 5YB 201 H	207bp	SYBR	
				Green	
		HR5 5YB 301 F / HR5 5YB 301 H	307bp	SYBR	
				Green	
		HR5 5YB 401 F / HR5 5YB 401 H	167bp	Touchdown	
		HR5 5YB 501 F / HR5 5YB 501 H	151bp	Touchdown	
		HR5 5YB 601 F / HR5 5YB 601 H	188bp	MGH	
Chip	Quantitative	HR5 601 F / HR5 601 H	77bp	MGH	
		HR5 601 R / HR5 601 R	156bp	MGH	
		HR5 601 L / HR5 601 L	151bp	MGH	
		HR5 601 J / HR5 601 J	77bp	MGH	
		HR5 601 F / HR5 601 F	151bp	MGH	
		HR5 601 R / HR5 601 R	151bp	MGH	
		HR5 601 L / HR5 601 L	151bp	MGH	
		HR5 601 J / HR5 601 J	77bp	MGH	
		HR5 601 F / HR5 601 F	151bp	MGH	
		HR5 601 R / HR5 601 R	151bp	MGH	
		HR5 601 L / HR5 601 L	151bp	MGH	
		HR5 601 J / HR5 601 J	77bp	MGH	
		HR5 601 F / HR5 601 F	151bp	MGH	
		HR5 601 R / HR5 601 R	151bp	MGH	
		HR5 601 L / HR5 601 L	151bp	MGH	

*View All Possible Screen Method

*View All Possible Gene-Specific Method

For Endogenous Reference Gene:

[Link](#) [Method](#) [Info](#) [HR5221 Copy No. Page](#) 1

Figura 4: Métodos basados en ácidos nucleicos para la detección de GTS 40-3-2 (sacado de Dong *et al.*, 2008)