

TÍTULO: Estudio mediante técnicas inmunoquímicas del efecto del procesado en algunas proteínas alergénicas y recombinantes de los alimentos.

Memoria presentada para optar al Premio de Investigación “Enrique Coris Gruart”

Modalidad B: Zootecnia, Producción Animal, Ciencia y Tecnología de los Alimentos, así como Ciencias Básicas relacionadas con la Veterinaria.

Convocatoria 2010

LEMA: Efecto del procesado en proteínas alergénicas y recombinantes de los alimentos.

ÍNDICE

I.- RESUMEN / ABSTRACT	1
II.- ANTECEDENTES	2
III.- METODOLOGÍA	7
III.1.- Desarrollo de técnicas inmunoquímicas.....	7
III.1.a.- Técnica de ELISA tipo competitivo indirecto.....	7
III.1.b.- Técnica de ELISA tipo sándwich.....	8
III.1.c.- Técnica de inmunocromatografía.....	9
III.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	10
III.3.- Western-blotting.....	10
III.4.- Determinación de masas moleculares por espectrometría de masas.....	10
III.5.- Elaboración de alimentos modelo.....	11
III.5.a.- Productos elaborados con leche y huevo en polvo.....	11
III.5.b.- Productos elaborados con maíz.....	12
III.6.- Extracción de proteínas en productos comerciales y en alimentos modelo.....	13
III.6.a.- Extracción de proteínas en productos con leche y huevo en polvo.....	13
III.6.b.- Extracción de proteínas en productos de maíz.....	13
III.7.- Aislamiento de la proteína Cry1A(b) del maíz transgénico.....	13
III.8.- Degradación de la proteína Cry1A(b) con pepsina porcina.....	14

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
IV.1.- Estudio mediante técnicas inmunoquímicas del efecto del procesado en la	
β-lactoglobulina bovina y el ovomucoide	15
IV.1.a.- Estudios previos	15
IV.1.b.- Estudio colaborativo para la evaluación de dos prototipos de tests de ELISA para	
la determinación de β- lactoglobulina y ovomucoide en alimentos modelo	16
IV.1.c.- Aplicación de una técnica de inmunocromatografía para la detección de	
β-lactoglobulina y ovomucoide en alimentos	24
IV.1.d.- Determinación de β-lactoglobulina y ovomucoide en alimentos comerciales	25
IV.2.- Estudio del efecto del procesado y la proteólisis sobre la proteína Cry1A(b)	
de maíz transgénico	29
IV.2.a.- Estudios previos	29
IV.2.b.- Estudio mediante técnicas inmunoquímicas del efecto del procesado sobre la	
proteína Cry1A(b)	30
IV.2.c.- Aislamiento y caracterización de la Cry1A(b) del maíz transgénico	36
IV.2.d.- Efecto de la hidrólisis con pepsina sobre la proteína Cry1A(b)	37
V.- CONCLUSIONES	43
VI.-REFERENCIAS	45

I.- RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado el efecto que tienen los tratamientos tecnológicos que se aplican en la industria alimentaria en la detección de las proteínas alergénicas β -lactoglobulina, de la leche, y ovomucoide, del huevo, y sobre la proteína Cry1A(b) del maíz transgénico. Para ello, se ha determinado la pérdida de reactividad de cada proteína con sus anticuerpos específicos mediante técnicas inmunoquímicas. Los resultados obtenidos indican que la detección de proteínas alergénicas en alimentos depende de las propiedades de la proteína diana, sobre todo de su termorresistencia, de la población de anticuerpos utilizada, de las características intrínsecas de la técnica usada y de la intensidad del tratamiento térmico aplicado. Los resultados obtenidos en el estudio de la proteína Cry1A(b) del maíz transgénico indican que es muy sensible al tratamiento térmico y a la degradación con pepsina, propiedades que no son compartidas por la mayoría de las proteínas alergénicas de los alimentos.

ABSTRACT

In this work, we have studied the effect that technological treatments usually applied in food industry have on the detection of the allergenic proteins milk β -lactoglobulin and hen ovomucoid, and of the Cry1A(b) protein from transgenic maize. We have determined the loss of reactivity of each protein with its specific antibodies using immunochemical techniques. Results obtained indicate that the detection of allergenic proteins in food depends on the properties of the target protein, especially its thermoresistance, the population of antibodies used, the intrinsic characteristics of the technique and the intensity of the heat treatment applied. The results obtained in the study of protein Cry1A (b) from transgenic maize indicate that it is very sensitive to heat treatment and pepsin degradation, properties that are not shared by most allergenic proteins of food.

II.- ANTECEDENTES

En los últimos años el consumidor está demandando el disponer de una mayor información acerca de diversos aspectos de los alimentos que consume. Entre ellos se encuentran aspectos relacionados con la seguridad de los ingredientes utilizados en la elaboración de un alimento, como por ejemplo la presencia de ingredientes alergénicos, y otros relacionados con el modo de producción de un alimento, como por ejemplo la presencia de ingredientes obtenidos de organismos genéticamente modificados (1). En este contexto ha tenido lugar la implantación de nuevas exigencias en el etiquetado, relativas a la presencia en los alimentos de dichos ingredientes.

La prevalencia de las alergias alimentarias está aumentando en los últimos años, y se asocia a cambios en los hábitos alimentarios de la población y a la mayor complejidad de los ingredientes y de los procesos tecnológicos utilizados en la industria alimentaria (2). Hasta la fecha, se han identificado más de 160 alimentos capaces de producir alergias, pero tan sólo 8 de ellos (huevo, cacahuete, leche, frutos secos, soja, pescados, mariscos y trigo) producen más del 95% de las reacciones alérgicas (3, 4). Los alérgenos alimentarios son proteínas, y se caracterizan por presentar una alta resistencia frente al procesado habitual que se lleva a cabo en la industria, tales como los tratamientos térmicos o ácidos, así como frente a la proteólisis por los enzimas digestivos, aunque hay excepciones (5).

Las proteínas lácteas y las de huevo son muy utilizadas en la industria alimentaria por sus buenas propiedades funcionales, pero, como se ha indicado anteriormente, también constituyen una de las principales causas de alergia alimentaria, especialmente en niños, con una prevalencia de alrededor del 7-8% en niños menores de dos años (6, 7, 8, 9). Aunque alrededor del 70% de los niños adquieren tolerancia al consumo oral de estos alimentos en los primeros 3 o 4 años de vida, en algunos individuos la alergia a la leche de vaca y al huevo pueden persistir en la edad adulta (10), estimándose una prevalencia en este grupo de

alrededor del 2% (11, 12, 13). Los mayores alérgenos de la leche de vaca son las α y β caseínas y la β -lactoglobulina, (14, 15, 16), y los mayores alérgenos del huevo son el ovomucoide, la ovalbúmina, y la ovotransferrina (17, 18).

El único método efectivo para evitar las reacciones alérgicas es evitar el consumo del alimento que causa la alergia. Por ello, resulta muy importante para un individuo alérgico conocer si un alimento contiene el o los componentes que le causan una alergia para evitar así su consumo. Esto sería posible si en la etiqueta de los alimentos se incluyesen de manera clara todos los ingredientes empleados en su elaboración, aunque se hayan añadido en una baja proporción. Con este objetivo, en el año 2003 se publicó una lista de 12 alimentos que pueden producir alergias o intolerancias, basándose en la severidad y la prevalencia de éstas. Estos alimentos o sus derivados deben estar correctamente indicados en las etiquetas de todos los alimentos envasados que los contienen (Directiva 2003/89/EC, Real Decreto 2220/2004). Esta lista inicial está abierta a la incorporación o eliminación de otros ingredientes dependiendo de las aportaciones científicas que se vayan introduciendo, de manera que, en los años siguientes, se han incluido diversas modificaciones que se reflejan en nuevas Directivas y Reales Decretos (Directiva 2005/26/CE, Real Decreto 1164/2005; Directiva 2006/142/CE, Real Decreto 36/2008; Directiva 2007/68/CE, Real Decreto 1245/2008).

Sin embargo, aún incluyendo de forma adecuada en la etiqueta todos los ingredientes que se utilizan en la elaboración de un determinado producto, existe la posibilidad de que alguno contenga una pequeña cantidad del o de los componentes alérgicos sin incluir en la etiqueta, debido a la presencia de los denominados “alérgenos ocultos”. Se consideran como “alérgenos ocultos” aquellos presentes en un producto alimentario, que pasan de forma desapercibida para el consumidor, y generalmente también para el productor. La presencia de estos alérgenos ocultos puede deberse a errores en la formulación, a deficiencias en la limpieza de las líneas de producción o a problemas de contaminación cruzada durante el

procesado, entre otros. Existen muy pocos datos sobre la frecuencia de contaminación de alimentos procesados que contienen ingredientes alergénicos sin declarar. En estudios realizados en la Unión Europea, se ha indicado que aproximadamente el 11,8 % de los productos analizados contenían proteínas lácteas sin estar indicado en la etiqueta. Este porcentaje fue del 7,3% y del 5,2% para las proteínas de huevo y de gluten de trigo, respectivamente (19). Por lo tanto, es necesario disponer de técnicas específicas y sensibles para su detección en los alimentos (20).

Por otra parte, el cultivo de vegetales genéticamente modificados ha aumentado en los últimos años. Mediante las modificaciones introducidas se pretende obtener alguna característica de interés, por medio de la introducción de un gen que codifica una nueva proteína, o de la modificación e incluso la supresión de la expresión de un gen propio. Las modificaciones genéticas más utilizadas en los cultivos vegetales son las que confieren resistencia a determinados insectos y tolerancia a ciertos herbicidas. La resistencia a insectos se consigue al insertar en la planta genes aislados de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que codifican toxinas de la familia Cry que afectan principalmente a lepidópteros y coleópteros. Los principales cultivos transgénicos comercializados que expresan estas toxinas son el maíz, la soja y el algodón (21). En España, en 2006 se cultivaron 70.000 hectáreas de maíz transgénico resistente a insectos, lo que equivale a alrededor del 21% de la superficie sembrada con maíz en ese año (22).

El cultivo y consumo de maíz derivado de la línea MON810 que contiene la proteína Cry1A(b) fue el primero con resistencia a insectos aprobado en la UE, con fecha 22 de Abril de 1998 (Decisión de la Comisión 98/294/CE), y hasta la fecha, otros ocho eventos más de maíz transgénico resistente a insectos han sido aprobados por la Unión Europea. Los genes Cry usados en estos cultivos frente a lepidópteros son los que codifican las proteínas insecticidas Cry1A(b) y Cry1F (23). El cultivo de variedades transgénicas representa ventajas

importantes para el agricultor, al facilitar la lucha contra plagas de insectos, lo que conlleva un aumento de la producción y una mejor gestión en el uso de insecticidas (21, 24). Sin embargo, estas ventajas no resultan casi nunca evidentes para los consumidores, dado que no han llegado a ellos en forma de nuevos productos de mayor calidad o de menor precio.

En los últimos años se ha cuestionado la utilización de vegetales transgénicos desde algunos sectores de la sociedad, acusándolos de representar un peligro para el medio ambiente y para la salud de los consumidores, siendo una de las principales preocupaciones la aparición de fenómenos de alergias. Esta desconfianza entre los consumidores se ha manifestado en peticiones a los gobiernos de mayores medidas de control, como la obligación de indicar la presencia de OGMs en los alimentos que los contienen (25). Como resultado, en la Unión Europea se obliga a declarar en la etiqueta la presencia de organismos genéticamente modificados (OGMs) en aquellos alimentos que sean OGMs, o él o sus ingredientes contengan o estén producidos a partir de OGMs, siempre que vayan al consumidor final o a colectividades. El umbral de presencia adventicia o accidental para el etiquetado se establece en un 0,9% por ingrediente, para los OGMs autorizados en la Unión Europea, y un 0,5% para OGMs con evaluación positiva pero que no han recibido la autorización administrativa correspondiente en la Unión Europea (Reglamento 1829/2003/EC). Además, el Reglamento 1830/2003/EC introduce un sistema armonizado para la trazabilidad y el etiquetado de los alimentos modificados genéticamente y sus derivados a lo largo de la cadena alimentaria.

La creciente demanda impuesta por la legislación europea en relación al etiquetado de alimentos, y la necesidad de controlar este etiquetado, han dado lugar a que, en los últimos años, se hayan desarrollado numerosos métodos para el análisis de los alimentos basados en la detección de proteínas alergénicas y recombinantes. La detección de estas proteínas se puede llevar a cabo directamente, mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas o inmunoquímicas (26, 27, 28, 29, 30), o indirectamente, mediante técnicas genéticas, que se

basan en el reconocimiento específico de fragmentos de DNA que codifican una determinada proteína (31, 32, 33).

Las técnicas inmunoquímicas están basadas en el reconocimiento de una determinada proteína por los anticuerpos específicos obtenidos frente a ella. Las principales ventajas de estas técnicas son su elevada sensibilidad y especificidad, por lo que son muy apropiadas para analizar una proteína minoritaria contenida en una mezcla compleja. Otras ventajas destacables de estas técnicas son su sencillez operativa, rapidez y bajo coste (34). La aplicación de las técnicas inmunoquímicas para el control de calidad ha experimentado un notable desarrollo y difusión en la industria alimentaria en los últimos años. Actualmente son varios los ensayos inmunoquímicos, sobre todo basados en la técnica de ELISA en placa y de inmunocromatografía, desarrollados para la determinación de proteínas alergénicas del huevo y de la leche (35, 36, 37, 38) y de la proteína Cry1A(b) del maíz transgénico (39, 40, 41, 42). Estas técnicas se han aplicado fundamentalmente en el análisis de alimentos comerciales con el objeto de comprobar si se cumple la normativa de etiquetado actualmente vigente.

Sin embargo, hay que considerar que, cuando estas técnicas van a ser aplicadas en el análisis de alimentos, la naturaleza y composición de los mismos, así como los tratamientos tecnológicos a los que se ha sometido durante su procesado, pueden dificultar la extracción de la proteína diana usada en el ensayo, así como la interacción con sus anticuerpos específicos (43). Por todo ello, es necesario realizar estudios que permitan determinar la termorresistencia de las proteínas utilizadas como diana en los análisis inmunoquímicos, así como elaborar alimentos modelo que las contengan para determinar el efecto que las distintas condiciones del procesado tienen sobre ellas. Estos estudios permitirían conocer las limitaciones que las técnicas inmunoquímicas tienen cuando van a ser aplicadas en el análisis de alimentos que han sido sometidos a un procesado industrial.

III.- METODOLOGÍA

III.1.- Desarrollo de técnicas inmunoquímicas

Para llevar a cabo el desarrollo de las técnicas inmunoquímicas indicadas en este trabajo, se obtuvieron antisueros en conejos mediante inoculación de las proteínas β -lactoglobulina, ovomucoide o de la proteína Cry1A(b) procedente de *Bacillus thuringiensis*. La caracterización de los antisueros se realizó mediante las técnicas de inmunodifusión doble, inmunolectroforesis e inmunodotting. Los anticuerpos específicos para cada proteína se aislaron de los antisueros mediante inmunoadsorción, utilizando una columna que contenía la proteína pura insolubilizadas en una matriz cromatográfica de Sepharose 4B.

Posteriormente, los anticuerpos se conjugaron con el enzima peroxidasa mediante la técnica del periodato o se unieron a microesferas de poliestireno carboxiladas coloreadas utilizando carbodiimida. Estos anticuerpos se utilizaron para desarrollar la técnica inmunoenzimáticas de ELISA en placa de tipo sándwich y la técnica de inmunocromatografía, respectivamente.

III.1.a.- Técnica de ELISA tipo competitivo indirecto

Las placas se tapizaron con 100 μ L/pocillo de una solución de β -lactoglobulina bovina u ovomucoide (5 μ g/mL) en tampón carbonato sódico 0,05 M, pH 9,6. Tras la incubación a 4°C durante toda la noche, las placas se lavaron 5 veces con 300 μ L/pocillo de agua destilada y se incubaron con 300 μ L/pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3% (p/v) en el caso de la β -lactoglobulina, y una solución de caseína al 1% (p/v) en el caso del ovomucoide, en tampón KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KCl 3 mM, NaCl 0,14 M pH 7,4 (PBS) a temperatura ambiente durante 2 horas, con el objeto de saturar todos los puntos de unión de proteínas. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces y se incubaron con 50 μ L/pocillo de las diferentes soluciones estándar, o de las muestras problema diluidas en PBS, y 50 μ L/pocillo de una dilución del antisuero correspondiente, a 37°C durante 1 hora. Tras 5 lavados con PBS

que contenía 0,05% de Tween-20 (PBST), se añadieron 100 μL /pocillo de una dilución adecuada de IgG de cabra anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa en PBS, que se mantuvieron a 37°C durante 1 hora. Por último, tras lavar los pocillos 5 veces, se añadieron 100 μL /pocillo de una solución del sustrato comercial, y tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μL /pocillo de H_2SO_4 2M. La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm en un lector de placas ELISA.

III.1.b.- Técnica de ELISA tipo sándwich

Las placas se tapizaron con 100 μL /pocillo de una solución de anticuerpos anti- β -lactoglobulina bovina o anti-ovomucoide (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o anti-Cry1A(b) (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en tampón carbonato sódico, 0,05 M, pH 9,6. Tras la incubación a 4°C durante toda la noche, las placas se lavaron 5 veces con 300 μL /pocillo de agua destilada y se incubaron con 300 μL /pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3% (p/v) en el caso de la β -lactoglobulina y de la Cry1A(b), y una solución de caseína al 1% (p/v) en el caso del ovomucoide, en PBS a temperatura ambiente durante 2 horas, con el objeto de saturar todos los puntos de unión de proteínas. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces con 300 μL /pocillo de agua destilada, y después, las placas se incubaron con 120 μL /pocillo de las diferentes soluciones estándar o de las muestras problema, a 37°C durante 1 hora.

Tras 5 lavados con PBST, se añadieron 100 μL /pocillo de una dilución de anticuerpos específicos para cada proteína obtenidos en conejo y marcados con peroxidasa, que se mantuvieron a 37°C durante 1 hora, tras lo que la placa se lavó 5 veces con PBST. Por último, se añadieron 100 μL /pocillo de una solución de un sustrato comercial, y tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μL /pocillo de H_2SO_4 2M. La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm en un lector de placas ELISA.

III.1.c.- Técnica de inmunocromatografía

El soporte inmunocromatográfico estaba constituido por una membrana de nitrocelulosa HiFlow Plus HFB13502 de dimensiones 3 cm x 4 mm y de 5-10 μm de tamaño de poro, que se había secado previamente a 60°C durante 5 minutos. A una distancia de 1,2 cm de la base, se aplicaron manualmente en una fina línea los anticuerpos específicos frente a las distintas proteínas, β -lactoglobulina, ovomucoide o Cry1A(b) (1 mg/mL en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,4 que contenía un 3% de metanol), y a una distancia de 1,8 cm de la base, se aplicaron IgG anti-IgG de conejo obtenidas en cabra y disueltas en el mismo tampón. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Las membranas que contenían los anticuerpos anti- β -lactoglobulina, anti-ovomucoide o anti-proteína-Cry1A(b) se bloquearon probando diferentes concentraciones de varias proteínas, como ovoalbúmina, albúmina sérica bovina, caseína o IgG. En todos los casos, se colocaron en los extremos de las tiras de nitrocelulosa unas membranas adsorbentes de celulosa, Accuwick Ultra en el extremo inferior del soporte, y Absorbent Paper Type 197 en el superior, y se sujetaron con cinta adhesiva alrededor. Las membranas se mantuvieron a temperatura ambiente, en un recipiente que contenía sílica gel. Para cada test, fue necesario optimizar el tampón en el que se diluyeron las microesferas tapizadas. Para ello, se ensayaron diluyentes que tenían diferente pH y concentración de NaCl, detergentes (SDS, Tween-20) y alcoholes (metanol, etanol), así como diferentes proporciones de microesferas y muestra. Para la realización del análisis cromatográfico, las microesferas tapizadas diluidas en el tampón correspondiente para cada proteína se mezclaron con la solución del extracto del alimento a analizar en un tubo de ensayo. A continuación, la tira reactiva se introdujo en el tubo, y se esperó 10 minutos hasta su observación visual. La aparición de una sola banda coloreada en el lugar de aplicación de las IgG anti-IgG de conejo indicaba la ausencia del analito en la muestra, mientras que la aparición de dos bandas coloreadas indicaba la presencia del analito en la muestra.

III.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las muestras se diluyeron con tampón Tris 10 mM, pH 8 que contenía EDTA 1mM. Posteriormente, a 90 µL de muestra, se le añadieron 10 µL de SDS al 25% (p/v, en agua destilada) y se mantuvieron en un baño a 100°C durante 5 minutos. Las muestras se aplicaron en geles comerciales que contenían un gradiente de 8 a 25% de acrilamida o de High Density. Las electroforesis se realizaron en un equipo Phast System (Pharmacia, Upsala, Suecia) siguiendo las recomendaciones que el fabricante establece para cada tipo de gel. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con el colorante Azul de Coomasie.

III.3.- Western-blotting

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando un equipo de transferencia MilliBlot-SDE Transfer System (Millipore, Bedford, MA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó utilizando una intensidad de 2 mA/cm² V durante 45 minutos. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, la nitrocelulosa se incubó con ovoalbúmina al 5% (p/v) en PBS, durante 2 horas, con el objeto de saturar todos los puntos de unión de proteínas de la nitrocelulosa. A continuación, la hoja de nitrocelulosa se incubó con una dilución apropiada del antisuero anti-proteína Cry1A(b) en ovoalbúmina al 3% (p/v) en PBS durante 2 horas. La hoja se lavó y se incubó con IgG anti-IgG de conejo conjugadas con peroxidasa, diluidas en ovoalbúmina al 3% (p/v) durante 2 horas. Tras otro lavado, para el revelado se incubó con 6 mg de 4-cloro-1-naftol disuelto en 2 mL de metanol, 8 mL de PBS y 10 µL de H₂O₂ al 30%.

III.4.- Determinación de masas moleculares por espectrometría de masas

Se depositó 1 µL de muestra en una placa portamuestras de MALDI-TOF, se dejó secar y se depositaron 0,5 µL de matriz, compuesta por ácido sinapínico (10 mgr/mL) en acetonitrilo 30%, TFA 0,3%, y se dejó secar de nuevo al aire. La determinación de la distribución de los pesos moleculares de las biomoléculas presentes en la muestra se realizó

utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF, Voyager STR de Applied Biosystems, midiendo en modo lineal positivo, con una voltaje aceleración de 20.000 v, y optimizando el tiempo de retardo y el gradiente de potencial según el rango de masa en el que se midió en cada caso. Los espectros fueron calibrados externamente con calmix 3 (1 picomol de insulina, thioredoxina y apomioglobina) para el rango de masas bajo y con BSA (1 picomol) para el rango de masas alto. Se obtuvieron las masas medias de los péptidos + 1 Da, en el caso de que la carga fuera +1 (+H), o las masas medias de los péptidos + 2 Da partido por 2, en el caso de que la carga sea +2 (2+H).

III.5.- Elaboración de alimentos modelo.

Los productos se han elaborado en una planta piloto siguiendo los procedimientos habituales usados por los fabricantes en la industria alimentaria.

III.5.a.- Productos elaborados con leche y huevo en polvo

Se han elaborado tres alimentos, pan, salchichas y paté, a los que se han añadido como ingredientes diferentes cantidades de leche y huevo en polvo, para obtener porcentajes de los mismos de 0,25 a 1%. Para obtener los porcentajes más bajos (0,005, 0,01, 0,05 y 0,1%), se mezcló la cantidad necesaria de muestra del 1% con la muestra del 0% de cada producto.

Las salchichas se elaboraron a partir de 3 kg de carne de cerdo, 3 kg de panceta de cerdo, 450 g de una mezcla comercial de especias, 900 g de almidón y 3 kg de hielo. Los ingredientes se mezclaron y se picaron y amasaron usando una cutter. A la mezcla amasada se le añadieron la leche y el huevo en polvo y se mezclaron usando un homogeneizador. La mezcla se embutió en tripas de celulosa (2,8 cm de diámetro), se introdujo en un horno y se cocinó hasta alcanzar una temperatura interna de 75°C. Las salchichas se envasaron al vacío y se calentaron a 90°C (temperatura interna) durante 1 minuto en un autoclave.

El pan se elaboró usando una máquina comercial. Para ello, una cantidad de 480 g de harina de trigo, 10 g de margarina, 20 g de azúcar, 5 g de sal, 8,8 g de levadura, 205 mL de

agua, y la leche y el huevo en polvo se amasaron durante 30 minutos y se dejaron 1 hora a temperatura ambiente para la fermentación de la masa. Entonces, la masa se horneó a 95°C (temperatura interna) durante 40 minutos.

El paté se preparó con 1,6 kg de hígado de cerdo, 2,5 kg de grasa de cerdo, 100 g de sal, 11 g de pimienta, 2,8 g de azúcar, 166 g de harina de maíz, 166 g de margarina y 840 mL de agua. La grasa de cerdo se picó, se calentó en agua a 85°C durante 30 minutos agitando de forma continua y se retiró del agua. Entonces, la grasa de cerdo, el hígado de cerdo y el resto de los ingredientes se mezclaron hasta obtener una pasta homogénea. A la pasta se le añadieron la leche y el huevo en polvo, y se mezclaron con una batidora. Una porción de 250 g de la mezcla se introdujo en recipientes de vidrio y se calentó a 120°C (temperatura interna) en un autoclave durante 1 hora.

III.5.b.- Productos elaborados con maíz

El proceso de nixtamalización se llevó a cabo calentando en agua (100 mL) los granos enteros de maíz transgénico (34 g) y óxido de calcio (50 mg) a 85°C durante 60 minutos o a 100°C durante 5 minutos, dejando en ambos casos los granos de maíz en remojo durante 15 horas a temperatura ambiente. Después de descartar el líquido de cocción (nejayote), el grano cocido se lavó dos veces con agua y se secó a 40°C en una estufa.

Para obtener la harina de maíz, los granos crudos y cocidos de maíz transgénico y no transgénico se molieron en un molino de martillos y se seleccionaron las partículas que pasaron por un tamiz de 300 μm .

Para preparar las tortillas de maíz, se mezclaron 300 g de harina de maíz crudo y 160 mL de agua, y la mezcla se amasó hasta obtener una masa no pegajosa. Cada porción de $20,0 \pm 0,1$ g se colocó en un pocillo y, mediante una prensa manual se obtuvieron discos de $2,2 \pm 0,1$ mm de grosor y $11,0 \pm 0,2$ cm de diámetro. Las tortillas a la plancha se prepararon calentando por ambas caras los discos de masa en una plancha a $200 \pm 10^\circ\text{C}$ durante

diferentes tiempos, y las fritas por inmersión de los discos en aceite de girasol a $190 \pm 10^{\circ}\text{C}$ durante diferentes tiempos.

Las farinetas, conocidas también como polenta, porridge o gachas, se prepararon mezclando 100 g de harina de maíz crudo y 300 mL de agua. La mezcla se calentó en un hornillo mientras se agitaba manualmente con una espátula y se registraba de forma continua la temperatura de la mezcla con una sonda.

III.6.- Extracción de proteínas en productos comerciales y en alimentos modelo

III.6.a.- Extracción de proteínas en productos con leche y huevo en polvo

A $3 \pm 0,1$ g de la muestra triturada se le añadieron 30 mL de PBS y la mezcla se mantuvo en agitación durante 15 minutos a 60°C . El extracto se clarificó mediante centrifugación a $3.000 \times g$ durante 15 minutos y se guardó a -20°C hasta su análisis.

III.6.b.- Extracción de proteínas en productos de maíz

A $4,0 \pm 0,1$ g de las muestras de tortillas fritas o a la plancha o de maíz nixtamalizado triturado se le añadieron 20 mL de tampón carbonato sódico 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 9,6, y a 10,0 g de las muestras de farinetas, 10 mL del mismo tampón, y se mantuvo en agitación durante 1 hora a 65°C . El extracto se clarificó por centrifugación a $13.000 \times g$ durante 15 minutos. El sobrenadante se neutralizó hasta un pH de 7,4, y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

III.7.- Aislamiento de la proteína Cry1A(b) del maíz transgénico

La proteína Cry1A(b) se aisló a partir de un extracto de hojas de maíz transgénico, por ser ésta la parte de la planta que contiene una mayor concentración de proteína Cry1A(b), unos $9,35 \mu\text{g/g}$ en la hoja fresca, frente a los $0,31 \mu\text{g/g}$ del grano (44). Las hojas de maíz se trituraron y una cantidad de 200 g se mezcló con 1 L de tampón carbonato sódico 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 9,5, y se mantuvo en agitación durante 2 horas. Entonces, la mezcla se filtró por lana de vidrio y el filtrado se centrifugó a $2.700 \times g$ durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró usando un cartucho de fibras huecas de punto de corte 1.000.000 para eliminar las

partículas grandes, se concentró por ultrafiltración usando una membrana de 10.000, y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Para aislar la proteína Cry1A(b) del extracto de hojas de maíz se preparó previamente un inmunoabsorbente que contenía los anticuerpos específicos anti-proteína Cry1A(b), previamente aislados, insolubilizados en Sepharose 4B. Tras aplicar el extracto, la columna se lavó con tampón fosfato potásico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4 hasta que la absorbancia del excluido a 280 nm fue menor a 0,02. Después, las proteínas retenidas se eluyeron con tampón glicina-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 2,6 que contenía dioxano al 10% y se neutralizaron inmediatamente. La proteína eluida se dializó frente a PBS, se liofilizó y se mantuvo a -20°C hasta su uso. Las fracciones enriquecidas en la proteína Cry1A(b) se dializaron frente a PBS, se concentraron por ultrafiltración y se caracterizaron mediante electroforesis, western-blotting y espectrometría de masas (huella peptídica y fragmentación).

III.8.- Degradación de la proteína Cry1A(b) con pepsina porcina

En este trabajo, se ha estudiado el efecto que tiene la hidrólisis con pepsina porcina sobre la proteína Cry1A(b) purificada del maíz transgénico. La proteína se disolvió en tampón HCl 84 mM, pH 2,0, a una concentración de 10 mg/mL. Para hidrolizar la proteína se utilizó pepsina porcina a una relación enzima/sustrato de 5% (p/p) y a una temperatura de 37°C . Se recogieron alícuotas a diferentes tiempos de incubación deteniéndose la reacción de tres maneras diferentes. Las muestras que iban a ser analizadas por electroforesis y western-blotting se mezclaron con tampón Tris 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 2,5%, pH 8,0 y se hirvieron inmediatamente durante 5 minutos. Las muestras que iban a ser analizadas por ELISA se diluyeron en PBS, y las que iban a ser analizadas por espectrometría de masas en tampón carbonato amónico 50 mM, pH 9,0.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.- ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS DEL EFECTO DEL PROCESADO EN LA β -LACTOGLOBULINA BOVINA Y EL OVOMUCOIDE

IV.1.a.- Estudios previos

Teniendo en cuenta las consideraciones descritas en los antecedentes, se planteó el desarrollo de técnicas inmunoquímicas para detectar la presencia de leche o huevo en alimentos procesados. Estas técnicas están basadas en la determinación de β -lactoglobulina de leche y ovomucoide de huevo, proteínas que se seleccionaron por ser cuantitativamente importantes, presentar una alta alergenicidad así como poseer una elevada termorresistencia.

El límite de detección de las técnicas inmunoquímicas desarrolladas para la detección de la β -lactoglobulina fue de 12 y 2 ng/mL, para los formatos de ELISA de tipo competitivo y de tipo sándwich, respectivamente y el de la técnica de inmunocromatografía de 0,5 μ g /mL. En el caso del ovomucoide los límites de detección de las técnicas de ELISA fueron de 23 ng/mL y 19 ng/mL para los formatos competitivo y sándwich, respectivamente y de 50 ng/mL para la inmunocromatografía.

Posteriormente, se estudió el efecto que el tratamiento térmico tiene sobre la desnaturalización de las proteínas alergénicas β -lactoglobulina y ovomucoide. Para ello, cada proteína se calentó en tubos capilares, y la cantidad de proteína inmunorreactiva se determinó utilizando las técnicas de ELISA desarrolladas. En ambas proteínas, se han observado cambios en la inmunoreactividad por efecto del tratamiento térmico, que indican una alteración en su conformación.

El estudio mostró que el cambio de conformación que tiene lugar en la β -lactoglobulina por efecto del tratamiento térmico aumenta inicialmente la inmunoreactividad de la proteína cuando se usa un antisuero obtenido frente a ella en un formato de ELISA de tipo competitivo indirecto, y la disminuye cuando se usan anticuerpos aislados por

inmunoadsorción en un formato de ELISA de tipo sándwich. Estas diferencias pueden atribuirse a que el antisuero contiene anticuerpos que reconocen tanto la forma nativa como la desnaturalizada de la proteína, mientras que en el aislamiento por inmunoadsorción se han seleccionado preferentemente aquellos anticuerpos que reaccionan con la forma nativa.

En cambio, el cambio de conformación del ovomucoide por efecto del tratamiento térmico disminuye la inmunorreactividad de la proteína, tanto si se usa un antisuero obtenido frente a ella en un formato de ELISA de tipo competitivo indirecto, como si se usan anticuerpos aislados por inmunoadsorción en un formato de ELISA de tipo sándwich, lo que indica que la población de anticuerpos usada en ambos ensayos reconoce preferentemente la forma nativa de la proteína.

Sin embargo, la β -lactoglobulina y el ovomucoide mantienen, tras ser sometidos a tratamientos térmicos intensos, una cierta reactividad residual con los anticuerpos obtenidos frente a ellos, lo que permite detectar ambas proteínas parcialmente desnaturalizadas utilizando técnicas inmunoquímicas.

IV.1.b.- Estudio colaborativo para la evaluación de dos prototipos de tests de ELISA para la determinación de β - lactoglobulina y ovomucoide en alimentos modelo.

La falta de materiales de referencia para la mayoría de los alérgenos, incluidos la leche y el huevo, hace que no sea posible llevar a cabo una adecuada validación de las técnicas desarrolladas para su determinación. Por ello, el análisis de alimentos modelo que contengan los ingredientes alergénicos, y que sean procesados en condiciones similares a las que se utilizan en la industria alimentaria, permitiría conocer las limitaciones que dichas técnicas tienen cuando van a ser aplicadas en la detección de alérgenos en alimentos procesados.

Con este objetivo, en este trabajo se prepararon alimentos modelo que contenían diferentes porcentajes de leche o huevo en polvo, en condiciones similares a las que se utilizan en la industria alimentaria, y se midió la cantidad de proteína inmunorreactiva que quedaba en

el producto tras su procesado. Este estudio se realizó utilizando unos prototipos de los test de ELISA tipo competitivo y sándwich para la determinación de β -lactoglobulina y ovomucoide, que habían sido preparados por una empresa de biotecnología siguiendo la metodología previamente desarrollada en nuestro laboratorio. Estos prototipos fueron objeto de un ensayo colaborativo realizado por tres laboratorios, que fue coordinado por nuestro grupo. Con este estudio se pretendía conocer qué formato de ELISA resultaba más sensible y específico para detectar la β -lactoglobulina y el ovomucoide, y por tanto, la presencia de leche y huevo, en alimentos complejos procesados. Las curvas de calibración obtenidas para cada ELISA utilizando estándares de proteína se muestran en las Figuras 1 y 2.

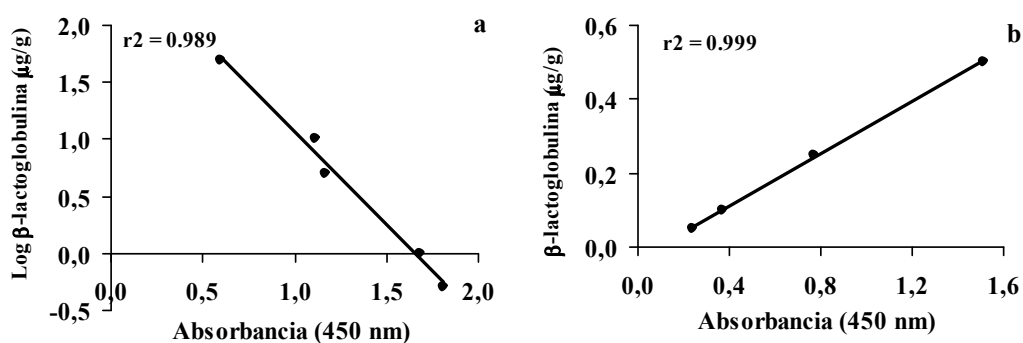


Figura 1: Curva de calibración obtenida para la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto (a) y sándwich (b) para la determinación de β -lactoglobulina utilizando estándares de proteína pura en PBS.

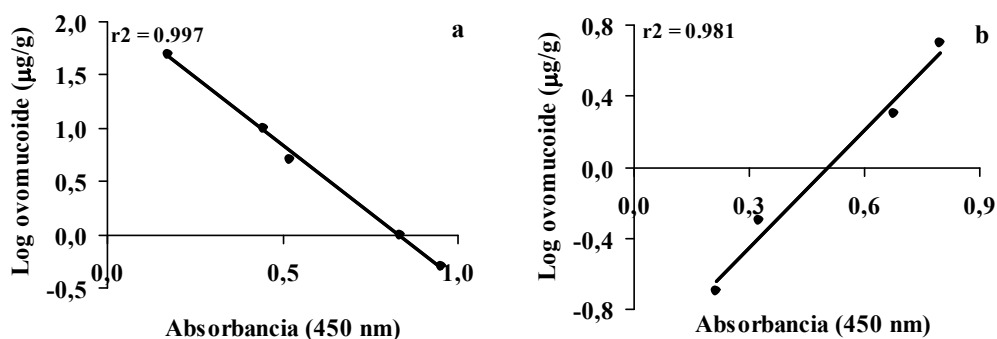


Figura 2: Curva de calibración obtenida para la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto (a) y sándwich (b) para la determinación de ovomucoide utilizando estándares de proteína pura en PBS.

Previamente, para determinar el efecto matriz y evaluar la especificidad de los anticuerpos, se analizaron diferentes ingredientes básicos que no contenían leche, huevo, o sus derivados, utilizando los cuatro tests de ELISA. Todos los ingredientes dieron unos valores de absorbancia ligeramente diferentes a los del blanco, indicando la presencia de interferencias, debido a reacciones inespecíficas de los anticuerpos con otros componentes de los alimentos. Por ello, el valor medio de la concentración de todos los ingredientes más tres veces la desviación estándar se consideró como el punto de corte o concentración límite de β -lactoglobulina u ovomucoide por encima de la cual una muestra de alimento se ha considerado positiva para la adición de leche o de huevo en este estudio.

En los ensayos competitivos, este valor fue de 0,40 $\mu\text{g/g}$ y 0,050 $\mu\text{g/g}$ de alimento para el ovomucoide y la β -lactoglobulina, respectivamente. En los ensayos de tipo sándwich, estos valores fueron de 0,20 y 0,005 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

La concentración de β -lactoglobulina en la leche en polvo utilizada para la elaboración de los alimentos modelo fue de 28,5 y 114,1 mg/g, mientras que la concentración de ovomucoide en el huevo en polvo fue de 21,0 y 32,1 mg/g, para los formatos competitivo indirecto y sándwich, respectivamente. Estas diferencias al usar dos formatos diferentes para detectar una misma proteína pueden atribuirse a las diferencias en los anticuerpos utilizados en cada ensayo.

La homogeneidad de las muestras de los alimentos modelo se comprobó analizando cinco muestras de cada alimento y concentración de leche en polvo por duplicado. El coeficiente de variación fue en todos los casos menor del 20%, por lo que este valor se consideró aceptable para el propósito de este estudio.

Los resultados individuales obtenidos por cada laboratorio, así como los valores medios y los coeficientes de variación se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1: Resultados obtenidos por los tres laboratorios, valores de la media (\bar{X}) y coeficientes de variación (CV) en el análisis de alimentos modelo elaborados con diferentes porcentajes de leche desnatada en polvo, usando la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto y sándwich para la detección de β -lactoglobulina. Los resultados están expresados en μg de β -lactoglobulina/ g de alimento.

Leche en polvo (%)	Competitivo					Sándwich				
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	\bar{X}	CV	Lab 1	Lab 2	Lab 3	\bar{X}	CV
Salchicha										
0	0,35	0,30	0,32	0,32	8	0,00	0,04	0,00	0,01	173
0,005	0,37	0,33	0,12	0,27	49	0,05	0,05	0,07	0,05*	20
0,01	0,21	0,22	0,43	0,29	43	0,10	0,12	0,13	0,12*	13
0,05	0,91	0,69	0,89	0,83*	15	0,34	0,39	0,44	0,39*	13
0,1	1,53	0,88	1,12	1,18*	28	0,54	0,60	0,70	0,61*	13
0,25	3,88	1,94	2,06	2,63*	41	0,67	0,68	0,77	0,71*	8
0,5	3,34	3,08	2,81	3,07*	9	0,72	0,65	0,79	0,72*	10
1	8,28	3,45	11,69	7,81*	53	0,75	0,67	0,72	0,72*	6
Pan										
0	0,10	0,23	0,32	0,22	51	0,01	0,04	0,02	0,02	65
0,005	0,33	0,27	0,12	0,30	45	0,02	0,02	0,02	0,02	0
0,01	0,14	0,16	0,29	0,20	41	0,02	0,03	0,04	0,03	33
0,05	0,24	0,24	0,41	0,30	26	0,15	0,18	0,20	0,17*	14
0,1	0,37	0,39	0,50	0,42	17	0,20	0,30	0,29	0,26*	21
0,25	1,16	0,74	1,90	1,27*	46	0,34	0,54	0,43	0,44*	23
0,5	2,20	0,94	2,15	1,77*	40	0,42	0,58	0,60	0,53*	18
1	6,75	4,49	7,97	6,40*	28	0,55	0,72	0,63	0,63*	14
Paté										
0	0,27	0,14	0,14	0,18	41	0,00	0,00	0,01	0,00	173
0,005	0,37	0,23	0,30	0,30	23	0,00	0,00	0,01	0,00	173
0,01	0,10	0,22	0,33	0,22	53	0,00	0,00	0,02	0,02	173
0,05	0,15	0,32	0,36	0,27	40	0,03	0,00	0,03	0,02	87
0,1	0,14	0,32	0,45	0,30	51	0,00	0,01	0,03	0,02	115
0,25	1,44	1,06	0,55	1,02*	44	0,09	0,18	0,23	0,17*	43
0,5	1,67	1,82	1,29	1,59*	17	0,10	0,17	0,23	0,17*	39
1	4,42	2,91	4,70	4,01*	24	0,17	0,40	0,24	0,27*	44

(*) Muestras de alimentos con valores de concentración por encima del punto de corte establecido para cada formato.

Tabla 2: Resultados obtenidos por los tres laboratorios, valores de la media (\bar{X}) y coeficientes de variación (CV) en el análisis de alimentos modelo elaborados con diferentes porcentajes de huevo en polvo, usando la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto y sándwich para la detección de ovomucoide. Los resultados están expresados en μg de ovomucoide/ g de alimento.

Huevo en polvo (%)	Competitivo					Sándwich				
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	\bar{X}	CV	Lab 1	Lab 2	Lab 3	\bar{X}	CV
Salchicha										
0	0,20	0,09	0,22	0,17	41	0,13	0,14	0,15	0,14	7
0,005	0,72	0,41	0,53	0,55*	28	0,36	0,34	0,34	0,35*	3
0,01	2,05	1,36	0,49	1,30*	60	0,52	0,68	0,56	0,59*	14
0,05	1,62	9,88	4,93	5,48*	76	0,57	0,75	1,03	0,78*	30
0,1	17,18	19,36	15,27	17,27*	12	1,42	0,95	1,32	1,23*	20
0,25	30,73	27,97	34,32	31,01*	10	1,99	1,11	1,21	1,44*	34
0,5	35,00	35,63	43,38	38,01*	12	1,47	1,38	1,55	1,47*	6
1	42,81	45,68	42,16	43,55*	4	1,95	1,06	1,52	1,51*	29
Pan										
0	0,21	0,15	0,21	0,19	18	0,16	0,19	0,27	0,16	28
0,005	0,12	0,10	0,13	0,12	13	0,14	0,14	0,15	0,14	4
0,01	0,17	0,11	0,22	0,17	33	0,14	0,14	0,16	0,15	8
0,05	0,48	0,64	0,56	0,56*	14	0,21	0,25	0,26	0,26*	11
0,1	0,53	0,56	0,62	0,57*	8	0,20	0,18	0,30	0,23*	28
0,25	2,91	5,09	2,47	3,49*	40	0,95	0,80	0,91	0,88*	9
0,5	2,71	4,80	8,26	5,26*	53	1,24	1,72	1,29	1,42*	19
1	12,52	31,57	10,12	18,07*	65	1,52	1,81	1,61	1,65*	9
Paté										
0	0,07	0,20	0,04	0,10	82	0,14	0,14	0,15	0,14	4
0,005	0,03	0,17	0,09	0,10	73	0,14	0,14	0,16	0,14	8
0,01	0,10	0,11	0,11	0,10	8	0,13	0,14	0,15	0,14	7
0,05	0,21	0,14	0,07	0,14	50	0,14	0,14	0,16	0,15	8
0,1	0,07	0,36	0,08	0,17	97	0,15	0,14	0,14	0,14	4
0,25	0,66	1,51	0,42	0,85*	66	0,14	0,15	0,15	0,15	4
0,5	2,07	1,77	1,11	1,65*	30	0,16	0,15	0,16	0,16	4
1	1,09	5,27	0,98	2,45*	100	0,14	0,15	0,15	0,15	4

(*) Muestras de alimentos con valores de concentración por encima del punto de corte establecido para cada formato.

Las muestras que no contenían leche o huevo en polvo dieron concentraciones de β -lactoglobulina y ovomucoide por debajo del punto de corte establecido para cada formato en los tres laboratorios y, por lo tanto, un resultado negativo. Este hecho indica que los puntos de corte establecidos para considerar una muestra como positiva resultaron adecuados en todos los casos para evitar las interferencias producidas por la matriz de los alimentos.

Para las muestras analizadas que contenían leche o huevo en polvo, se observó que el porcentaje de ambos ingredientes necesario para dar un resultado positivo con los dos formatos usados dependía de la intensidad del tratamiento térmico aplicado, siendo mayor para el paté (esterilizado), seguido del pan (horneado) y de la salchicha (pasterizada). Además, para el mismo porcentaje de leche o huevo en polvo añadidos a las muestras consideradas como positivas, las concentraciones de β -lactoglobulina y ovomucoide fueron mayores para la salchicha, seguidas del pan y del paté. Este hecho se debe a que el tratamiento térmico da lugar a la desnaturalización y/o agregación de la β -lactoglobulina y del ovomucoide, y como consecuencia, a una pérdida de su inmunorreactividad, que es mayor cuanto mayor es la intensidad del tratamiento. Esto también explica que las concentraciones de β -lactoglobulina y ovomucoide determinadas en los alimentos modelo fueran mucho menores que las estimadas a partir de la leche (entre el 0,5 y el 5%) y el huevo en polvo (entre el 5 y el 45%) añadidos como ingredientes, sobre todo en el caso de los productos sometidos a un tratamiento más intenso. El hecho de que las recuperaciones hayan sido mayores para el ovomucoide que para la β -lactoglobulina se debe probablemente a su mayor termorresistencia.

Las recuperaciones obtenidas en nuestro trabajo para el ovomucoide en el producto sometido al tratamiento térmico menos intenso, la salchicha, son similares a las obtenidas en otros trabajos en alimentos elaborados con huevo en polvo, como galletas (36, 45) y mermelada (36). En los productos sometidos a un tratamiento térmico más intenso, las recuperaciones fueron menores que las indicadas en el trabajo de Matsuda *et al.*, (45) al

analizar alimentos modelo como salchichas, preparados cárnicos o mermelada, que variaron entre un 63 y un 89% para la leche, y entre un 67 y un 95% para el huevo.

Al analizar los alimentos modelo que contenían leche con los tests para la determinación de β -lactoglobulina, el ensayo de tipo sándwich resultó tener una mayor sensibilidad que el competitivo, ya que dio un resultado positivo a porcentajes más bajos de leche añadida, del orden de diez veces menor en las muestras de salchicha y de cinco veces menor en las de pan. Para el paté, ambos formatos mostraron una sensibilidad similar, resultando las muestras positivas a una concentración de leche en polvo del 0,25%. Las diferencias en la sensibilidad de los tests ensayados podrían deberse en parte a que las interferencias con otros componentes del alimento son mayores en el formato competitivo, dificultando la detección de la β -lactoglobulina cuando se encuentra en una baja concentración.

En el caso de los tests para la determinación de ovomucoide, ambos formatos mostraron una sensibilidad similar en las muestras de salchicha y de pan, dando un resultado positivo a porcentajes de huevo añadido de 0,005 y 0,05%, respectivamente. Sin embargo, para las muestras de paté, sólo con el ensayo competitivo se pudo detectar el ovomucoide, a concentraciones de huevo añadido del 0,25% o superiores, mientras que no se detectó con el ELISA de tipo sándwich, a pesar de que en este ensayo se probaron diferentes condiciones de extracción, como la utilización de hexano para eliminar la grasa, y tampones con agentes desnaturalizantes como SDS.

Los porcentajes de huevo en polvo detectados en nuestro trabajo son similares a los indicados por Leduc *et al.* (46) mediante un ELISA competitivo, que fueron de 0,03% en productos cárnicos crudos y pasterizados (70°C, 2 horas), y de 0,125% en los esterilizados (115°C, 90 minutos). En el trabajo realizado por Matsuda *et al.*, (45), se detectó la adición de una cantidad de 0,001% de leche y huevo en todos los productos, a pesar de estar sometidos a

distintos tipos de procesado. Este porcentaje es similar al obtenido en nuestro trabajo en el producto pasterizado (salchicha), pero menor que el detectado en el producto horneado (pan), y el esterilizado (paté). Estas diferencias se pueden atribuir a que los productos elaborados en el trabajo de Matsuda *et al.* (45) habían sido sometidos a tratamientos térmicos menos intensos que los aplicados en nuestro trabajo. Por otra parte, hay que destacar que la concentración de β -lactoglobulina y ovomucoide estimada en los productos que dieron un resultado positivo fue mayor en el formato competitivo que en el sándwich, a pesar de que los extractos de alimentos analizados fueron los mismos en todos los tests. Estas diferencias pueden atribuirse a la diferente población de anticuerpos y a las características intrínsecas de cada formato (47).

Diferentes estudios han mostrado que los resultados cuantitativos obtenidos al usar diferentes tests inmunoquímicos pueden variar ampliamente. En el trabajo de Matsuda *et al.* (45), compararon dos tests de ELISA para determinar proteínas de huevo y dos tests para determinar proteínas lácteas en alimentos procesados, y encontraron diferencias en la concentración media para una misma muestra de hasta el 127% y el 198%, respectivamente. En un estudio de validación interlaboratorial de cinco tests comerciales para la determinación de cacahuete en alimentos, la variación en la concentración obtenida en las mismas muestras entre los diferentes tests varió entre 44% y 191% para las diferentes concentraciones (48).

Por otra parte, los coeficientes de variación obtenidos en el estudio colaborativo, para las muestras de salchicha y de pan, fueron en la mayor parte de los casos mayores cuando se usaron los formatos de tipo competitivo que los de sándwich. Esta mayor variabilidad puede atribuirse a las diferentes pendientes de las curvas de calibración obtenidas en cada formato, que fueron mayores en el caso del ELISA de tipo competitivo. Así, para una pequeña variación en los valores de absorbancia, la variación en los valores de concentración es mayor en el formato competitivo que en el sándwich. Para las muestras de paté, los coeficientes de

variación fueron muy altos en todos los casos, debido posiblemente a interferencias con la matriz, producidas por el alto contenido en grasa de este producto..

En un estudio interlaboratorial llevado a cabo por Poms *et al.* (48) para la determinación de proteínas de cacahuete añadidas a muestras de galleta a niveles de 2,5, 5 y 10 ppm, los valores de reproducibilidad descritos, expresados como la desviación estándar interlaboratorial relativa (RSD_R) fueron de 127,0%, 73,6% y 58,2%, respectivamente, para el mismo test de ELISA. Sánchez *et al.* (49) realizaron un estudio interlaboratorial para validar un test ELISA para determinar proteínas de soja en muestras de leche, y encontraron valores de RSD_R entre 14,0 y 74,5 %. En el estudio llevado a cabo por Matsuda *et al.* (45) para la detección de proteínas de leche y huevo en alimentos procesados, los valores de RSD_R para los dos tests de ELISA usados fueron menores de 17% en todas las muestras analizadas.

IV.1.c.- Aplicación de una técnica de inmunocromatografía para la detección de β -lactoglobulina y ovomucoide en alimentos

En el análisis de los alimentos modelo utilizando este test se detectó la adición de leche en polvo a porcentajes de 0,05%, 0,5% y 1%, en las muestras de salchicha, pan y paté, respectivamente, mientras que, con la técnica de ELISA de tipo competitivo, se detectaron porcentajes entre 2 y 5 veces menores, y entre 10 y 20 veces menores con la de tipo sándwich. Por tanto, la sensibilidad de la técnica de inmunocromatografía desarrollada en este trabajo para la detección de β -lactoglobulina es más baja que la obtenida para las técnicas de ELISA en placa.

Para el ovomucoide, la sensibilidad de la técnica de inmunocromatografía fue ligeramente más baja que la obtenida por las técnicas de ELISA. En el análisis de los alimentos modelo, se detectó la adición de huevo en polvo a porcentajes de 0,01%, 0,05% y 0,5%, en las muestras de salchicha, pan y paté. El porcentaje detectado en el pan coincidió con

el detectado por las técnicas de ELISA, y fue dos veces menor en las muestras de salchicha y paté usando el ELISA de tipo competitivo.

En estudios realizados con individuos alérgicos a la leche o al huevo, se ha indicado que es muy difícil establecer la dosis de un determinado alimento que da lugar a una reacción alérgica, dada la gran variabilidad que existe en la sensibilidad de los diferentes individuos. A pesar de ello, se ha estimado que la sensibilidad de los tests de detección de alérgenos debería estar comprendida entre 1 y 10 ppm de las proteínas diana seleccionadas (50). Por lo tanto, y teniendo en cuenta que no existe un límite establecido por la legislación, ni unas muestras de referencia para realizar una comparación, los tests desarrollados en este trabajo tendrían la sensibilidad suficiente para detectar, en alimentos procesados, la cantidad de leche o huevo necesaria para proteger a la mayoría de las personas sensibilizadas a esos alimentos. Sin embargo, dado que pueden existir personas con una elevada sensibilidad a la leche o al huevo, la ausencia total de riesgo en esos casos sería imposible de asegurar.

Por lo tanto, y a pesar de su menor sensibilidad con respecto a otras técnicas inmunoquímicas, la inmunocromatografía es una técnica suficientemente sensible para la detección de alérgenos, lo que único a su rapidez y sencillez, la hacen ideal como técnica de cribado en los laboratorios de control de calidad, como control de contaminación o verificación de limpieza *in situ* durante la producción, o incluso para ser usada a nivel casero (home test) (51, 52).

IV.1.d.- Determinación de β -lactoglobulina y ovomucoide en alimentos comerciales

Con el objeto de comprobar si se cumple la legislación de etiquetado de alérgenos, en este trabajo se analizaron diversos alimentos comerciales en los que se indicaba o no la presencia de leche, huevo, o sus derivados en la etiqueta, utilizando los tests de ELISA desarrollados. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 3 y 4.

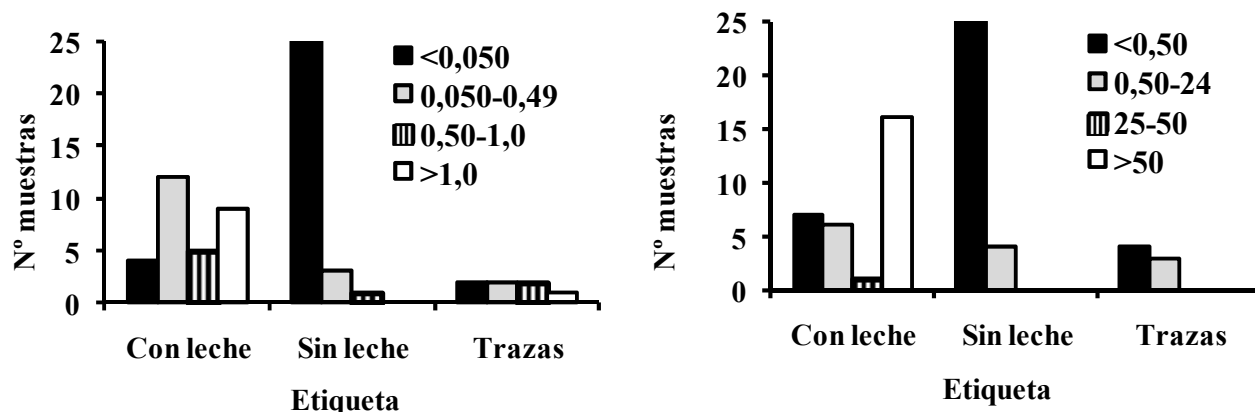


Figura 3: Análisis de alimentos comerciales mediante la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto (a) y sándwich (b). Los alimentos se han clasificado en tres grupos: productos en cuya etiqueta se indicaba o no la presencia de leche o derivados, y productos en los que se indicaba la presencia de trazas de leche. Cada grupo se dividió en los cuatro rangos de concentración de β -lactoglobulina que están indicados en la leyenda ($\mu\text{g/g}$).

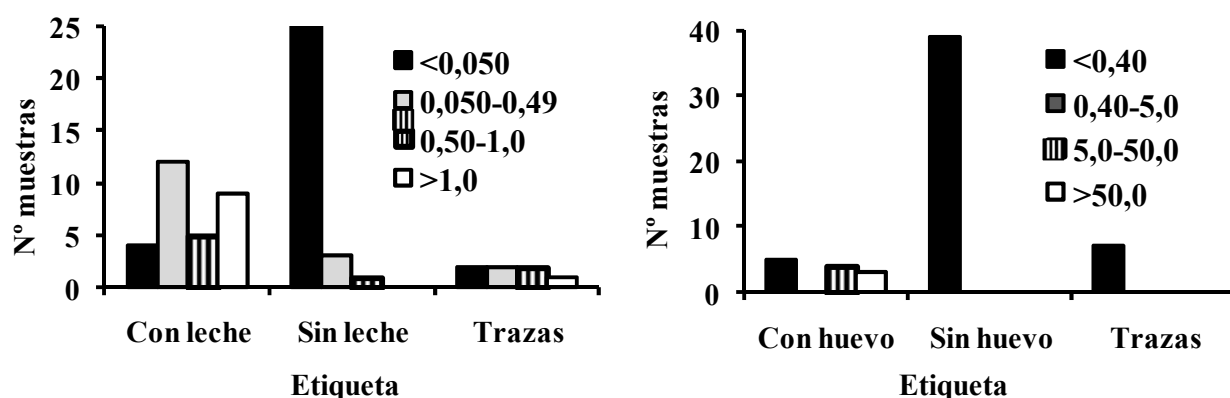


Figura 4: Análisis de alimentos comerciales mediante la técnica de ELISA tipo competitivo indirecto (a) y sándwich (b). Los alimentos se han clasificado en tres grupos: productos en cuya etiqueta se indicaba o no la presencia de huevo o derivados, y productos en los que se indicaba la presencia de trazas de huevo. Cada grupo se dividió en los cuatro rangos de concentración de ovomucoid indicados en la leyenda ($\mu\text{g/g}$).

El porcentaje de productos comerciales que ha dado un resultado positivo con los tests para la detección de β -lactoglobulina, sin declarar la presencia de leche o derivados en su etiqueta ha sido de aproximadamente el 14%. Este porcentaje es mayor que el indicado por el Standing Committee for Food Stuffs de la Comisión Europea (19), al analizar 838 muestras “sin leche”, provenientes de 6 países de la Unión Europea, que fue del 2,3%. Sin embargo, Hefle y Lambrecht (35), al analizar alimentos en los que no se declaraba la presencia de leche,

encontraron que todas las muestras de chocolate negro, y el 12% de las 27 muestras de sorbetes, zumos de frutas y refrescos analizadas contenían caseína. La presencia de proteínas lácteas sin declarar en los alimentos puede deberse a una contaminación entre líneas durante el procesado, a una incorrecta limpieza de los equipos compartidos, e incluso a la adición de ingredientes lácteos intencionadamente, sin haberlos declarado en la etiqueta.

Ninguno de los siete productos en los se indicaba la presencia de trazas de huevo, ni de los 39 productos comerciales analizados en cuya etiqueta no se indicaba la presencia de huevo o sus derivados, dio una concentración de ovomucoide por encima del punto de corte establecido en los tests, al igual que se ha indicado en otros trabajos en los que se ha determinado la presencia de proteínas de la clara en diferentes productos procesados como pasta, salsas, productos cárnicos, galletas y pan (38, 53, 54). En cambio, Hefle *et al.* (37) detectaron la presencia de proteínas de huevo en el 55% de las 22 muestras de pasta analizadas que no contenían huevo según la etiqueta, hecho que se debe probablemente a que han sido fabricados en la misma línea de producción que la pasta con huevo, sin una adecuada limpieza entre ambas producciones.

Del total de 30 productos comerciales en los que se indicaba en la etiqueta la presencia de leche o derivados, el 80% dieron concentraciones de β -lactoglobulina por encima del punto de corte establecido cuando se analizaron por ambos formatos de ELISA. De los 7 productos en los que su etiqueta indicaba “puede contener trazas de leche”, entre el 42 y el 71% dieron un resultado por encima del punto de corte establecido, para el formato competitivo y el sándwich, respectivamente. En el caso de los 12 productos comerciales analizados en los que se indicaba en la etiqueta la presencia de huevo o derivados, el 60% de ellos dieron concentraciones de ovomucoide por encima del punto de corte establecido cuando se analizaron por ambos formatos de ELISA.

El hecho de que algunas de las muestras que incluían como ingrediente leche, huevo, o sus derivados en la etiqueta, o trazas de estos, dieran un resultado negativo, puede deberse a que se han añadido fracciones que no contienen dichas proteínas, como lactosa, la fracción caseína de la leche o la yema del huevo, o a que la cantidad añadida es tan baja, o la desnaturalización debida al tratamiento térmico tan fuerte, que no puede ser detectada por los tests utilizados. Además, puede deberse incluso a que se haya producido un cambio en la formulación sin que se hayan cambiado las etiquetas.

Es de destacar que, para el consumidor alérgico, lo más importante es que en la etiqueta de los alimentos se indique la presencia de los ingredientes frente a los que es sensible, para así evitar su consumo. Sin embargo, es también importante que lo declarado en la etiqueta refleje la formulación utilizada, ya que, si no, se restringe la gama de productos para el consumidor alérgico. Asimismo, es importante no abusar del etiquetado preventivo indicando la presencia de “trazas” o “puede contener”, ya que su uso indiscriminado supone también una restricción en la elección de productos para esta población. Por ello, este etiquetado preventivo sólo debería usarse como último recurso cuando, debido a las características del proceso de fabricación, y a pesar de seguir unas buenas prácticas de fabricación y haber realizado una correcta evaluación del riesgo, no se pueda garantizar la ausencia de los componentes alérgicos (55).

Las inmunocromatografías desarrolladas en este trabajo para la detección de leche y huevo, basadas en la determinación de β -lactoglobulina y ovomucoide, han sido objeto de una patente que se ha transferido a una empresa del sector del diagnóstico alimentario y ya las ha comercializado. Asimismo, el test de ELISA tipo sándwich para la detección de leche y el competitivo indirecto para la detección de huevo han sido también transferidos y comercializados por la misma empresa.

IV.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL PROCESADO Y LA PROTEOLISIS SOBRE LA PROTEÍNA Cry1A(b) DE MAÍZ TRANSGÉNICO

IV.2.a.- Estudios previos

Una causa importante de rechazo de los alimentos transgénicos por parte del consumidor es la posible alergenicidad de las proteínas expresadas, que no se encontraban en el alimento no transgénico. Dado que una propiedad que comparten la mayoría de las proteínas alergénicas contenidas en los alimentos es la de poseer una alta termorresistencia, en un trabajo previo, nuestro grupo estudió el efecto que tienen los tratamientos térmicos en la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) y se determinaron los parámetros cinéticos y termodinámicos de su desnaturalización. Este estudio se llevó a cabo determinando la pérdida de reactividad de la proteína Cry1A(b) con sus anticuerpos específicos utilizando una técnica de ELISA de tipo sándwich previamente desarrollada

Para estudiar el efecto que el tratamiento térmico tiene sobre la proteína Cry1A(b), se calentó a diferentes temperaturas un extracto concentrado de hojas de maíz transgénico en tubos capilares, y la cantidad de proteína inmunorreactiva se determinó a diferentes tiempos de tratamiento usando la técnica de ELISA.

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto de los tratamientos térmicos sobre la proteína Cry1A(b) indican que se trata de una proteína termosensible, ya que sólo se necesitan tratamientos de 2 minutos a 75°C y a 77°C para desnaturalizar un 50% y un 70% de la proteína, respectivamente. El alto valor de la energía de activación obtenido para la proteína Cry1A(b) (266,15 kJ/mol) indica que se rompen un gran número de enlaces de baja energía durante su desnaturalización. Además, los altos valores del incremento de la entalpía de activación obtenidos para la proteína Cry1A(b), de aproximadamente 263 kJ/mol, indican que esta proteína sufre un considerable cambio en su conformación durante su desnaturalización.

IV.2.b.- Estudio mediante técnicas inmunoquímicas del efecto del procesado sobre la proteína Cry1A(b)

Existen diferentes inmunoensayos, basados en la determinación de la proteína Cry1A(b), que se han usado para determinar la presencia de vegetales transgénicos, como soja y maíz. Estas técnicas tienen una sensibilidad suficiente cuando se analizan materiales sin procesar, como grano y harina (40, 41, 56, 57). Sin embargo, la baja termorresistencia de la proteína Cry1A(b), observada en el trabajo previo realizado, podría limitar la utilidad de este tipo de ensayos cuando se van a analizar alimentos procesados (58).

El estudio de termorresistencia de la proteína Cry1A(b) que se había realizado inicialmente se llevó a cabo utilizando un extracto de hojas, y no del grano de maíz transgénico, debido a la mayor concentración de proteína Cry1A(b) presente en las hojas, y a que viscosidad de las soluciones de harina hacían difícil su manejo, al coagular en los capilares donde se trataba térmicamente. En el presente estudio, el efecto del procesado sobre la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) se ha realizado utilizando alimentos modelo elaborados con harina de maíz transgénico.

La determinación de la proteína Cry1A(b) se realizó utilizando la técnica de ELISA tipo sándwich, cuya curva de calibración fue lineal en el rango de 10 ng/mL a 200 ng/mL ($r^2 \geq 0,99$), teniendo un límite de detección de 7,4 ng/ml (Figura 5).

También se analizaron productos elaborados de forma similar con maíz no transgénico, los cuales dieron valores de absorbancia por debajo del límite de detección establecido. La concentración de la proteína Cry1A(b) determinada en harina de maíz transgénico sin procesar fue de 0,28 µg/g, similar a la concentración descrita para semillas de maíz que contienen el evento MON810 (44).

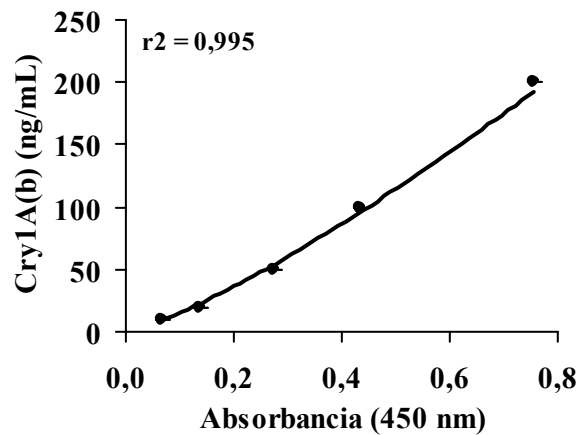


Figura 5: Curva de calibración obtenida para la determinación de la concentración de la proteína Cry1A(b) utilizando una técnica de ELISA tipo sándwich.

La nixtamalización es un método muy común en la preparación de maíz para hacer masa y tortillas en México, América Central y EE.UU. (59, 60). Este proceso consiste en calentar los granos de maíz en una solución de óxido de calcio. Los beneficios de la nixtamalización son una mejor calidad proteica y una mayor disponibilidad de niacina y lisina, además de un incremento en el contenido de calcio en la harina obtenida (59). Los resultados obtenidos en este trabajo para el maíz nixtamalizado indican que la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) es mayor cuando se trata la proteína a 85°C durante 60 minutos (60% de desnaturalización) que a 100°C durante 5 minutos (30% de desnaturalización). Estos resultados sugieren que el tiempo de tratamiento tiene un efecto más marcado que la temperatura sobre la desnaturalización de la proteína Cry1A(b), debido probablemente a la penetración lenta del calor en el grano, como resultado del efecto protector del pericarpio. Debido a que el tratamiento de nixtamalización afecta al reconocimiento de la proteína Cry1A(b) por parte de los anticuerpos específicos, tanto las tortillas como las farinetas se elaboraron con harina de maíz procedente de granos que no habían sido sometidos a un proceso de nixtamalización.

Para la elaboración de las farinetas, se mezcló harina procedente de maíz transgénico y agua, y se calentó mientras se agitaba manualmente. La temperatura de la mezcla se incrementó gradualmente con el tiempo hasta alcanzar 70°C, temperatura a la cual aumentó mucho la viscosidad de la mezcla debido a la gelatinización del almidón. Después, la temperatura se incrementó lentamente y no superó los 82°C hasta los 10 minutos de calentamiento. La concentración de proteína Cry1A(b) inmunorreactiva no cambió significativamente hasta que la mezcla alcanzó una temperatura de 75°C, pero disminuyó un 90% tras tres minutos a esa temperatura (Figura 6).

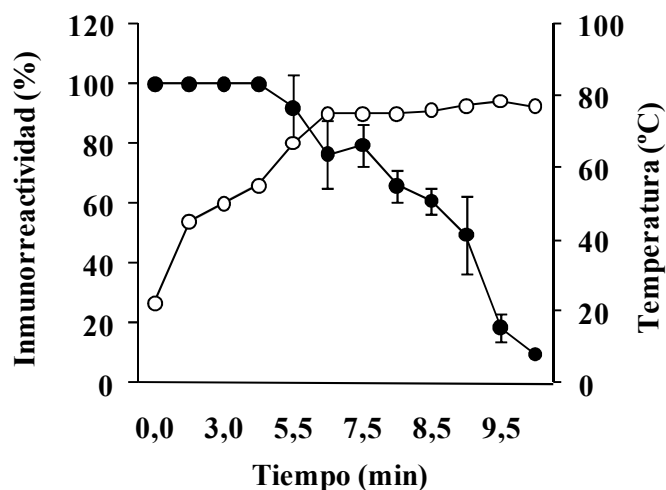


Figura 6: Cambios en la concentración de la proteína Cry1A(b) (●) y en la temperatura (○) durante la preparación de farinetas elaboradas con harina de maíz transgénico. Los valores corresponden a la concentración de proteína inmunorreactiva determinada mediante una técnica de ELISA tipo sándwich, y están expresados como porcentaje de la concentración de proteína en la muestra sin tratar (100%).

Al comparar los resultados obtenidos durante la elaboración de las farinetas con los obtenidos al calentar el extracto de hojas, se observa que la desnaturalización de la proteína Cry1A(b) es más rápida para la proteína tratada en la harina de maíz, debido probablemente a la agregación de la proteína Cry1A(b) con otras proteínas, lo cual enmascara epítomos que son reconocidos por los anticuerpos. Así, al tratar el extracto de hojas a 77°C, se necesitan 10

minutos para desnaturalizar el 90% de la proteína, mientras que en la harina, se obtuvo la misma disminución tras tres minutos a esa temperatura. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Van den Bulcke *et al.* (61), quienes, utilizando un test comercial de inmunocromatografía, indicaron que la proteína Cry1A(b) se detectó después de tratar la harina durante 1 hora a 55°C, pero no tras un tratamiento a 80°C durante el mismo tiempo.

La desnaturalización de la proteína Cry1A(b) también se determinó en tortillas a la plancha y fritas elaboradas con maíz transgénico (Figura 7). La desnaturalización de la proteína Cry1A(b) en las tortillas fue mucho más rápida que en las farinetas, debido a las altas temperaturas usadas en su preparación. Así, la concentración de proteína inmunorreactiva disminuyó hasta el 62 y el 8% del valor inicial en tortillas calentadas en una plancha a 180°C durante 10 y 20 segundos, respectivamente, y no se pudo detectar proteína en tortillas calentadas durante 25 segundos o más. En el caso de las tortillas fritas, la proteína Cry1A(b) se desnaturalizó rápidamente, quedando alrededor de un 65% de proteína inmunorreactiva tras 5 segundos a 190°C, y no se detectó proteína a tiempos más prolongados de tratamiento. El hecho de que la desnaturalización fuera mucho más rápida en las tortillas fritas, en comparación con las tratadas a la plancha, a pesar de que la diferencia de temperatura fue de sólo 10°C, podría deberse a que el aceite favorece la penetración del calor en el producto durante la fritura.

Los alimentos modelo se analizaron también mediante una técnica de inmunocromatografía diseñada con anticuerpos anti-proteína Cry1A(b) cuyo límite de detección fue de 10 ng/mL. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos con la técnica de ELISA tipo sándwich, salvo en el caso de los dos tiempos de tratamiento más prolongado de las farinetas que dieron un resultado negativo sólo por la técnica de inmunocromatografía.

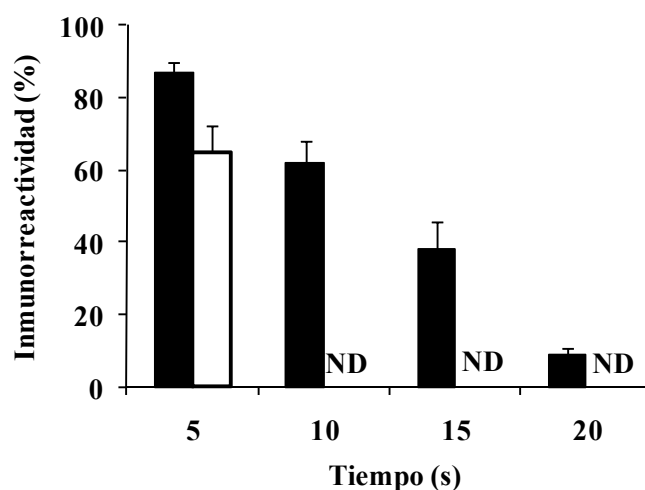


Figura 7: Determinación de la proteína Cry1A(b) en tortillas a la plancha (■) y fritas (□) elaboradas con harina de maíz transgénico, después de un tratamiento durante diferentes tiempos a 180°C y a 190°C, respectivamente. Los valores corresponden a la concentración de proteína inmunorreactiva determinada mediante una técnica de ELISA tipo sándwich, y están expresados como porcentaje de la concentración de proteína en la muestra sin tratar (100%). ND: No detectado.

Existen muy pocos trabajos acerca de la determinación de proteínas Cry mediante inmunoensayos (42, 62) o PCR (63, 64) en productos procesados. Los resultados obtenidos por Lipp *et al.* (64) mediante la técnica de PCR, basada en la detección del fragmento promotor 35s, mostraron que la técnica era adecuada para detectar maíz transgénico que había sufrido un tratamiento térmico severo, de 100°C durante 45 minutos y de 180°C durante 10 minutos. Un resultado similar fue observado por Hupfer *et al.* (63), basados en la detección del fragmento promotor Cry03/04 en muestras de polenta, ya que éste fue detectado tras 105 minutos de calentamiento a 100°C.

Sin embargo, los resultados obtenidos en otros trabajos indican que las técnicas de PCR o inmunoquímicas pueden detectar el maíz transgénico en alimentos poco procesados, tales como polenta precocinado y piensos, mientras que no es posible detectarlo en alimentos altamente procesados, tales como tortillas o copos de maíz (42, 61, 62, 65, 66).

Margarit *et al.* (42) determinaron la proteína Cry1A(b) mediante una técnica de ELISA comercial, y el gen Cry1A(b) mediante una técnica de PCR en diferentes alimentos comerciales y piensos para alimentación animal. La presencia del gen Cry1A(b) se detectó en productos crudos o poco procesados, como piensos o polenta sin cocinar o precocinada. Sin embargo, no se pudo amplificar ni el gen de la Cry1A(b) ni el gen que codifica la zeína del maíz en el DNA aislado de productos muy procesados, como copos y sirope de maíz, debido probablemente a la presencia de inhibidores y a la poca cantidad de DNA presente tras el procesado. Excepto en un pienso, la proteína Cry1A(b) se detectó en todos los productos que dieron un resultado positivo por PCR, y no se detectó en los que dieron un resultado negativo por dicha técnica. La concentración de la proteína Cry1A(b) en los productos que dieron un resultado positivo fue muy baja en todos los casos, menor de 0,1 µg/g.

Díaz *et al.* (62) determinaron la concentración de la proteína Cry9C en alimentos procesados elaborados con harina de maíz StarLink. Los autores indicaron que la cantidad de proteína Cry9C inmunorreactiva que quedaba en muestras de pan de maíz, muffins y polenta fue de un 13%, 5% y 3% de la proteína presente en el grano, respectivamente. La proteína Cry9C se detectó en 7 de las 10 muestras de alimentos muy procesados, como tortillas, puffs o copos de maíz, pero el porcentaje de proteína inmunorreactiva fue menor del 0,2%, a pesar de que esta proteína es más termorresistente que la proteína Cry1A(b) (67).

Es importante señalar que el proceso de elaboración típico de las farinetas conlleva el calentamiento de la harina de maíz en agua hirviente durante 10 ó 15 minutos (68), el procesado de tortillas a la plancha un tratamiento a 240°C durante 30 segundos por cada cara (69) y el de tortillas fritas, un tratamiento a 190°C durante 60 segundos (59). Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que el alto grado de desnaturalización sufrido por la proteína Cry1A(b) durante el procesado probablemente no permitiría su detección en los productos finales al usar técnicas inmunoquímicas.

El Reglamento 1829/2003/EC sobre etiquetado de alimentos y piensos transgénicos indica que todos los alimentos y piensos que contengan, estén compuestos o se hayan producido a partir de OGMs aprobados, en cantidades mayores de 0,9%, deben estar indicados en la etiqueta. El Reglamento exige también que se etiqueten los alimentos que contienen ingredientes libres de DNA o proteínas, como los aceites vegetales refinados o los jarabes de glucosa, producidos a partir de OGMs. Por ello, dada la baja concentración de proteína Cry1A(b) que se expresa en el maíz transgénico, y la baja termorresistencia de dicha proteína, el etiquetado de alimentos que contienen maíz transgénico debería realizarse en base a los resultados obtenidos en el análisis de los ingredientes utilizados para su elaboración, y con el seguimiento de los mismos mediante un adecuado sistema de trazabilidad.

IV.2.c.- Aislamiento y caracterización de la Cry1A(b) del maíz transgénico

La proteína Cry1A(b) de maíz transgénico se ha aislado utilizando un inmunoadsorbente. Las fracciones enriquecidas en la proteína Cry1A(b) se caracterizaron mediante electroforesis, western-blotting y espectrometría de masas (huella peptídica y fragmentación).

En la electroforesis de la proteína aislada por inmunoabsorción, además de la banda de 70 kDa, que corresponde al peso molecular de la proteína Cry1A(b) (70), se observaron otras bandas minoritarias de menor tamaño, que reaccionaban con los anticuerpos anti-proteína Cry1A(b) de *B. thuringiensis* al analizarlos por la técnica de Western-blotting. Las bandas se recortaron del gel, y se realizó de cada una un análisis de identificación de proteínas por huella peptídica por la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF), comparando los péptidos obtenidos con los péptidos teóricos indicados en la base de datos NCBI nr para la proteína Cry1A(b). En todos los casos las proteínas identificadas superaron la puntuación de Mascot estimada para que la probabilidad fuera ≤ 0.05 , es decir que las coincidencias no se debieran al azar, indicando un alto grado de homología con la proteína Cry1A(b) de *B. thuringiensis*.

Se determinó además la reactividad cruzada que existe entre la proteína Cry1A(b) obtenida de *B. thuringiensis* y la aislada de maíz transgénico utilizando una técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto, incubando una placa tapizada con la proteína procedente de *B. thuringiensis* con concentraciones crecientes de ambas proteínas. La reactividad cruzada entre ambas proteínas fue del 95%, lo que indica que entre ellas existe una identidad inmunológica. Estos resultados indican que las bandas observadas por electroforesis en la fracción aislada corresponden a fragmentos de la proteína Cry1A(b), que son probablemente producidos por la acción de las proteasas endógenas del maíz. La presencia de varios fragmentos ha sido también observada por electroforesis y western-blotting en otros trabajos al analizar la proteína Cry1A(b) aislada de hojas de maíz transgénico (44, 70, 71).

IV.2.d.- Efecto de la hidrólisis con pepsina sobre la proteína Cry1A(b)

Este estudio se ha realizado utilizando la proteína Cry1A(b) aislada por inmunoadsorción. Se ha determinado el efecto que tiene la digestión *in vitro* sobre dicha proteína, utilizando únicamente la pepsina, debido a que la proteína que se expresa en el maíz MON810 es la forma activa de la toxina, que es el núcleo de ésta resistente a la tripsina (70, 72, 73). Como comparación, se estudió también el efecto de la digestión con pepsina sobre la proteína Cry1A(b) activada con tripsina purificada de *Bacillus thuringiensis*.

Para llevar a cabo este estudio, la proteína aislada del maíz transgénico se incubó con pepsina, y se extrajeron muestras a diferentes tiempos de tratamiento. Hasta la fecha, es el primer trabajo en el que se lleva a cabo un estudio de digestión *in vitro* con proteína purificada procedente de maíz transgénico. Debido a que se trata de una fracción purificada, las muestras tratadas se pudieron caracterizar por métodos inmunoquímicos además de por otras técnicas, como electroforesis y espectrometría de masas.

La concentración de proteína Cry1A(b) inmunorreactiva a diferentes tiempos de tratamiento se determinó mediante la técnica de ELISA tipo sándwich. Los resultados

obtenidos (Figura 8) indican que la pepsina hidroliza la proteína rápidamente, ya que su inmunorreactividad disminuye a un 27% del valor inicial en los primeros 30 minutos de tratamiento, manteniéndose estos niveles tras 4 horas. Sin embargo, la proteína Cry1A(b) de *B. thuringiensis* se degrada por la pepsina más lentamente. La inmunorreactividad disminuyó al 70% de la inicial en los primeros 30 minutos, y al 23% en 2 horas, permaneciendo este porcentaje constante hasta las 4 horas de tratamiento. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos al analizar por la técnica de ELISA el producto de la digestión in vivo de maíz transgénico en cerdos, terneros y vacas (74, 75). Estos resultados indicaron que la proteína fragmentada mantiene una baja pero significativa reactividad con los anticuerpos al usar la técnica de ELISA, probablemente porque algunos de ellos reconocen fragmentos todavía inmunorreactivos de la proteína Cry1A(b).

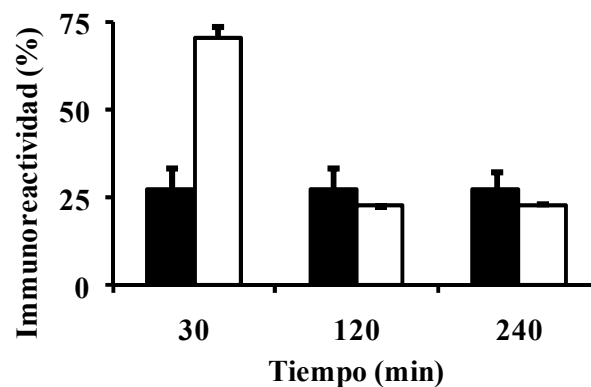


Figura 8: Determinación de la proteína Cry1A(b) de maíz transgénico (■) o de *B. thuringiensis* (□), después de un tratamiento con pepsina a pH 2,0 a diferentes tiempos. Los valores corresponden a la concentración de proteína inmunorreactiva determinada mediante una técnica de ELISA tipo sándwich, y están expresados como porcentaje de la concentración de proteína en la muestra sin tratar (100%).

Posteriormente, para determinar el tamaño de los fragmentos de proteína Cry1A(b) detectados por ELISA, las muestras obtenidas durante la incubación con pepsina se analizaron también por electroforesis, Western-blotting y espectrometría de masas. En la electroforesis,

no se observó la proteína de 70 kDa ni los fragmentos observados en la purificación de la proteína a ningún tiempo de tratamiento, encontrándose tan sólo fragmentos menores de 14 kDa y una banda muy débil de 34 kDa al utilizar geles de acrilamida de 8-25% (Figura 9). Estas mismas muestras se analizaron utilizando geles de alta densidad para obtener una mejor separación de los péptidos de bajo peso molecular, y se obtuvieron bandas de entre 6 y 8 kDa, además de la débil banda de 34 kDa (Figura 9). Al analizar la muestra tratada con pepsina durante 30 minutos con la técnica de espectrometría de masas, cubriendo un rango molecular de entre 1 y 100 kDa, sólo se hallaron péptidos menores de 8,5 kDa. La Figura 10 muestra el perfil de la espectrometría de masas de esta fracción en el rango entre 1,6 y 12 kDa, donde se hallaron todos los fragmentos. Del mismo modo, no se detectó la banda de 70 kDa de la proteína de *B. thuringiensis* en las muestras tratadas con pepsina en todos los tiempos de incubación, y tan sólo se halló una banda de aproximadamente 34 kDa al utilizar geles de acrilamida de 8-25% (Figura 9).

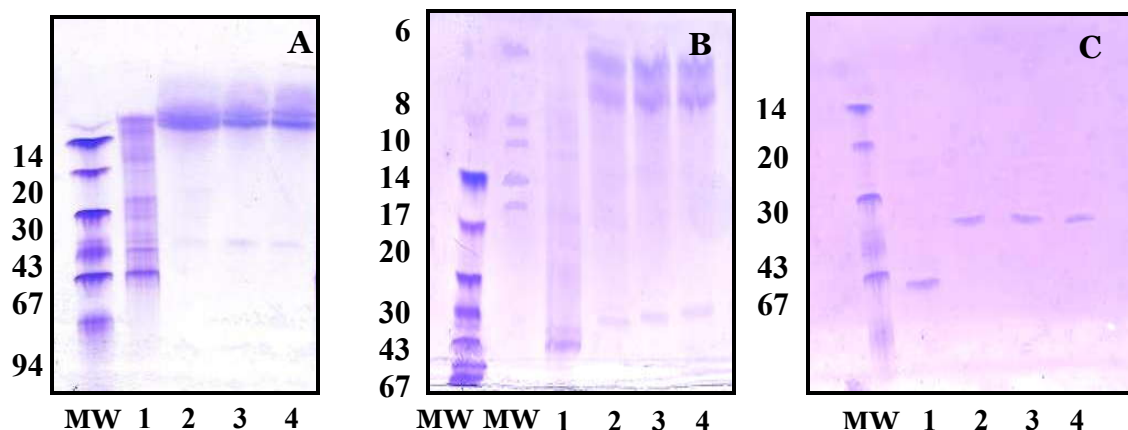


Figura 9: Electroforesis en gel de poliacrilamida de gradiente 8-25% (A, C) y de alta densidad (B) de la proteína Cry1A(b) de maíz transgénico (A, B) o de *B. thuringiensis* (C) sometidas a hidrólisis con pepsina a pH 2,0 durante 0 minutos (1), 30 minutos (2), 2 horas (3) y 4 horas (4). PM: patrón de pesos moleculares (kDa).

Los péptidos de la proteína CRy1A(b) de maíz transgénico o de *B. thuringiensis* obtenidos tras el tratamiento con pepsina se transfirieron del gel de electroforesis a nitrocelulosa y fueron analizados por Western-blotting utilizando antisueros anti-Cry1A(b). Los resultados mostraron la ausencia de reacción en todas las muestras estudiadas (resultados no mostrados).

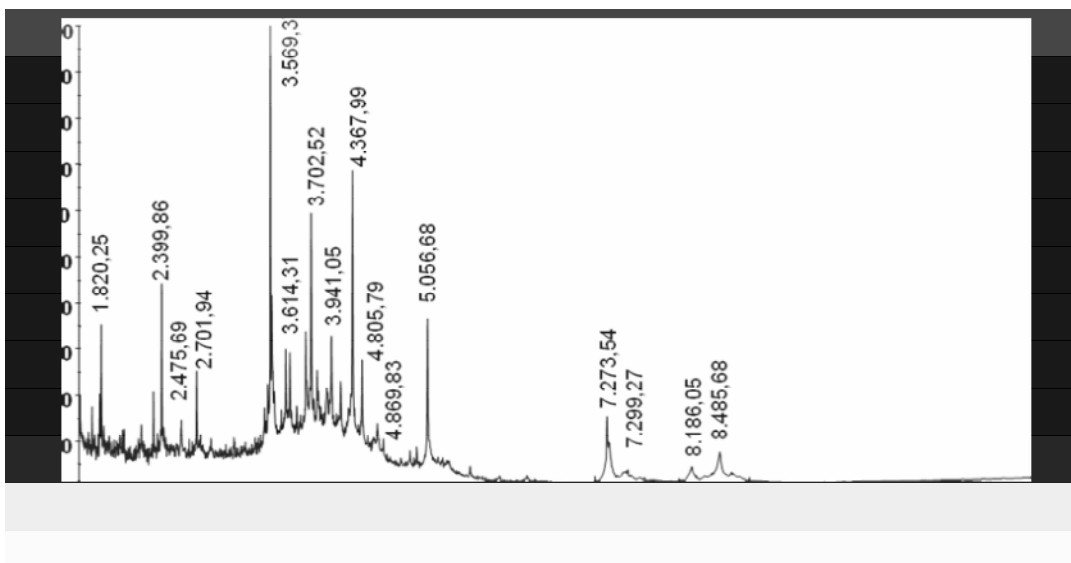


Figura 10: Perfil obtenido por la técnica de espectrometría de masas de la proteína Cry1 A(b) tratada con pepsina durante 30 minutos.

La ausencia de reacción de los fragmentos obtenidos en la proteólisis de la proteína Cry1A(b) por Western-blotting han sido observado previamente al estudiar la degradación por pepsina de la proteína Cry1A(b) expresada en *E. coli* o en extractos de maíz (76, 77). En estos trabajos, no se observó reacción entre las muestras de proteína incubadas con pepsina durante 30 minutos y los antisueros anti-Cry1A(b) policlonales (11) o monoclonales (13) al utilizar esta técnica. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo y en otros por Western-blotting contrastan con los obtenidos por ELISA, y pueden deberse a problemas en la transferencia de los péptidos pequeños, a pesar de que se ensayaron diferentes tiempos de

transferencia e intensidades de voltaje. La falta de reacción de los péptidos con los anticuerpos por Western-blotting podrían deberse también a la menor sensibilidad de esta técnica comparada con la técnica de ELISA.

Sin embargo, en otros trabajos, se ha indicado la presencia de la proteína Cry1A(b) o de sus fragmentos producidos durante la digestión in vivo de maíz transgénico que reaccionan con los anticuerpos mediante Western-blotting (74, 75, 78). Las diferencias obtenidas en los diversos estudios de proteólisis podrían deberse a varios factores, como los diferentes eventos de maíz transgénico analizados, las condiciones de degradación y la sensibilidad de los anticuerpos utilizados en casa ensayo.

Nuestros resultados obtenidos por electroforesis están de acuerdo con los obtenidos por Lutz et al. (78) al estudiar la degradación in vivo de la proteína Cry1A(b) en vacas adultas alimentadas con maíz transgénico Bt176. Estos autores, utilizando antisueros policlonales y monoclonales, no observaron la presencia de la proteína completa (60 kDa) en el contenido gastrointestinal, mientras que si hallaron fragmentos de 34y 17 kDa. Debido a que ellos usaron geles de acrilamida de 4-12%, es posible que el fragmento observado de 17 kDa corresponda a fragmentos de menor masa molecular, como los que nosotros observamos al utilizar geles de alta densidad, que separan los péptidos en el rango de peso molecular bajo, o cuando determinamos el tamaño molecular por espectrometría de masas.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la proteína Cry1A(b), tanto la procedente de maíz transgénico como la procedente de *B. thuringiensis*, se degradan rápidamente por acción de la pepsina. Sin embargo, ambas muestras mostraron diferentes patrones de fragmentación, dando la proteína de maíz unos péptidos de menor peso molecular que la proteína bacteriana. Estas diferencias podrían deberse a que la proteína del maíz ha sido parcialmente digerida por proteasa endógenas, ya sea en la planta o durante la extracción

previa a la incubación con pepsina. Por lo tanto, la posibilidad de que la proteína Cry1A(b) se encuentre parcialmente degradada al ser ingerida debe ser tomada en cuenta.

Recientemente, se ha puesto mucha atención en los alimentos procedentes de plantas genéticamente modificadas, debido al riesgo de que puedan provocar alergias, y se ha llevado a cabo diversos trabajos para estudiar este hecho. Los estudios llevados a cabo con sueros humanos procedentes de pacientes alérgicos han mostrado que no se ha obtenido respuesta por prick test ni se han detectado IgE frente a la proteína Cry1A(b) en suero (71, 77).

Para conocer si un alimento puede ser alergénico, se puede llevar a cabo por métodos indirectos relacionados con las características fisicoquímicas de la proteína expresada, como la resistencia a la degradación por enzimas digestivos (5). Obviamente, la cinética de disminución del pH y la liberación de enzimas digestivos son difíciles de reproducir, al tener lugar en condiciones fisiológicas. Sin embargo, un examen de la resistencia a la proteólisis utilizando sistemas modelo estandarizados se considera una información útil para estudiar la potencial alergenicidad de los cultivos transgénicos. Para ser alérgica, una proteína debe alcanzar el tracto digestivo en una forma lo suficientemente intacta como para provocar la acción del sistema inmune. Si la proteína es rápidamente degradada bajo las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal, parece improbable que resulte alergénica. En este sentido, la proteína Cry1A(b) es una proteína que muestra una rápida y extensa degradación por la pepsina, propiedad que no poseen la mayoría de las proteínas alergénicas de los alimentos.

V.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

Primera: De las dos técnicas de ELISA desarrolladas en este trabajo para la determinación de β -lactoglobulina, el formato de tipo sándwich resulta, por su mayor sensibilidad y especificidad, más adecuado que el de tipo competitivo indirecto para detectar la presencia de leche en alimentos procesados.

Segunda: De las dos técnicas de ELISA desarrolladas en este trabajo para la determinación de ovomucoide, el formato de tipo competitivo indirecto resulta más adecuado para detectar la presencia de huevo en alimentos procesados que el de tipo sándwich.

Tercera: La técnica de inmunocromatografía desarrollada, basada en la detección de β -lactoglobulina, es entre 2 y 20 veces menos sensible que las técnicas de ELISA en placa para detectar la presencia de leche en alimentos procesados. En cambio, la inmunocromatografía para la detección de ovomucoide tiene una sensibilidad similar que la técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto para detectar la presencia de huevo en alimentos procesados. La sencillez y rapidez de la técnica de inmunocromatografía hace que sea la técnica de elección para ser usada como “home test” o para el control “*in situ*” de contaminación de alérgenos en la industria alimentaria.

Cuarta: La proteína Cry1A(b) se desnaturaliza rápidamente por los tratamientos tecnológicos que habitualmente se utilizan en la industria alimentaria, resultando en un marcado descenso en la concentración de proteína inmunorreactiva. Así, el alto grado de desnaturalización sufrido por dicha proteína durante la elaboración de productos tales como las farinetas, las tortillas fritas o a la plancha, no permitiría su detección en los productos finales cuando se usan técnicas inmunoquímicas. Por ello, el etiquetado de maíz transgénico debería realizarse en base a los resultados obtenidos en el análisis de los ingredientes

utilizados para su elaboración, y el seguimiento de los mismos mediante un sistema adecuado de trazabilidad.

Quinta: La proteína Cry1A(b) se degrada en 30 minutos por acción de la pepsina porcina, dando lugar mayoritariamente a péptidos de entre 6 y 8 kDa. La proteína hidrolizada mantiene alrededor de un 27% de su inmunorreactividad al analizarla por la técnica de ELISA, lo que indica que los péptidos formados contienen algunos epítomos que son reconocidos por los anticuerpos usados en el ensayo.

Sexta: El conjunto de los resultados obtenidos en el estudio de la proteína Cry1A(b) aislada de maíz transgénico indican que es una proteína muy sensible al tratamiento térmico y a la degradación con pepsina, propiedades que no son compartidas por la mayoría de las proteínas alergénicas conocidas de alimentos.

VI.- REFERENCIAS

1. Cheftel, J.C. 2005. Food Chemistry, 93, 531-550.
2. Monaci, L., Tregoat, V., van Hengel, A. *et al.* 2006. Eur Food Res Technol, 223, 149-179.
3. Food and Drug Organization of the United Nations. 1995. Rome, Italy, November, 13-14.
4. Besler, M., Steinhart, H. & Paschke, A. 2001. J Chromatogr, 756, 207-228.
5. Taylor, S.L. & Lehrer, S.B. 1996. Crit Rev Food Sci Nutr, 36(S), S91-S118.
6. Matsumura, T., Kuroume, T., Oguri, *et al.* 1975. Ann Allergy, 35, 221-229.
7. Cant, A., Marsden, R.A. & Kilshaw, P.J. 1985. Brit Med J, 291, 932-935.
8. Zarkadas, M., Scott, F.W., Slaminene, J. *et al.* 1999. Canada J Allergy Clin Immunol, 4(3), 118-141.
9. Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A., Flabbée, J. *et al.* 2001. J Allergy Clin Immunol, 108, 133-140.
10. Høst, A. 1997. J R Soc Med, 90(S30), 31-39.
11. Bock, S.A., Lee, W.Y., Remigio, L.K. *et al.* 1978. J Allergy Clin Immunol, 62, 327-334.
12. Bernhisel-Broadbent, J., Dintzis, H.M., Dintzis, R.Z. *et al.* 1994.. J Allergy Clin Immunol, 93, 1047-1059.
13. Besler, M., Eighenmann, P. & Schwartz, R.H. 2002. Internet symposium on food allergens, 4, 19-106. <http://www.food-allergens.de>
14. Bleumink, E. & Young, E. 1968. Int Arch Allergy Appl Immunol, 34, 521-543.
15. Docena, G.H., Fernández, R., Chirido, F.G. *et al.* 1996. Allergy, 51, 412-416.
16. Wal., J.M. 1998. Allergy, 53, 1013-1022.
17. Langeland, T. 1982. Allergy, 37, 521-530.
18. Hoffman, D.R. 1983. J Allergy Clin Immunol, 71, 265-268.
19. Standing Committee for Foodstuffs. 1997. European Commission, Brussels.
20. Nordlee, J.A. & Taylor, S.L. 1995. Food Technology. 2: 129-132.

21. Jouanin, L., Bonadé-Bottino, M., Girard *et al.* 1998. *Plant Sci*, 131, 1-11.
22. James, C. 2006. ISAAA (Ithaca) Briefs 35. <http://www.isaaa.org/>
23. http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_print_en.efm, 16/10/2008.
24. Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P. *et al.* 2002. *Eur Food Res Technol.* 214: 3-26.
25. Moseley, B.E.B. 1999. *Int J Food Microbiol*, 50, 25-31.
26. Carrera, E., García, T., Céspedes, A. *et al.* 1997. *J Sci Food Agr*, 74, 547-550.
27. Mackie, I.M., Craig, A., Etienne, M. *et al.* 2000. *Food Chem*, 71, 1-7.
28. Mayer, H.K. 2005. *Int Dairy J*, 15, 595-604.
29. Berrini, A., Tepedino, V., Borromeo, V. *et al.* 2006. *Food Chemistry*, 96, 163-168.
30. Liu, L.H., Chen, F.C., Dorsey, J.L. *et al.* 2006. *J Food Sci*, 71, M1-M6.
31. Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R. *et al.* 1999. *Meat Sci*, 51, 143-148.
32. Bottero, M.T., Civera, T., Anastasio, A. *et al.* 2002. *J Food Prot*, 65, 362-366.
33. Terzy, V., Morcia, C., Gorrini, A. *et al.* 2005. *J Cereal Sci*, 41, 213-220.
34. Rittenburg, J.H. 1990. En: *Development and Application of Immunoassays for Food Analysis*, págs. 29-57. J.H. Rittenburg (Ed), Elsevier Applied Science, Londres.
35. Hefle, S.L. & Lambrecht, D.M. 2004. *J Food Prot*, 67, 1933-1938.
36. Watanabe, Y., Aburatani, K., Mizumura, T. *et al.* 2005. *J Immunol Methods*, 300, 115-123.
37. Hefle, S.L., Jeanniton, E. & Taylor, S.L. 2001. *J Food Prot*, 64, 1812-1816.
38. Yeung, J., Newsome, H. & Abbott, M. 2000. *J AOAC Int*, 83, 139-143.
39. Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K. *et al.* 1999. *J AOAC Int*. 82: 923-928.
40. Walschus, U., Witt, S. & Wittmann, C. 2002. *Food Agric Immunol*, 14: 231-240.
41. Roda, A., Mirasoli, M., Guardigli, M. *et al.* 2006. *Anal Bioanal Chem*, 384: 1269-1275.
42. Margarit, E., Reggiardo, M.I., Vallejos, R.H. *et al.* 2006. *Food Res Int*, 39, 250-255.
43. Ellman, L., Chatchatee, P., Sicherer, S. *et al.* 2002. *Ped Allergy Immunol*, 13, 295-298.
44. AGBIOS. 2004. GMO Database. <http://www.agbios.com/dbase.php>.

45. Matsuda, R., Yoshioka, Y., Akiyama, H. *et al.* 2006. *J AOAC Int*, 89, 1600-1608.
46. Leduc, V., Demeulemester, C., Polack, B. *et al.* 1999. *Allergy*, 54, 464-472.
47. Yeung, J. 2006. En: *Detecting Allergens in Foods*, págs. 109-124. Koppelman, S.J. & Hefle, S.L. (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.
48. Poms, R.E., Agazzi, M.E., Bau, A. *et al.* 2005. *Food Addit Contam*, 22, 104-112.
49. Sánchez, L., Pérez, M.D., Puyol, P. *et al.* 2002. *J AOAC Int*, 85, 1390-1397.
50. Poms, R.E., Klein, C.L. & Anklam, E. 2004. *Food Addit Contam*, 21, 1-31.
51. Van Herwijnen, R. 2006. En: *Detecting Allergens in Foods*, págs. 175-181. Koppelman, S.J & Hefle, S.L. (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.
52. Asensio, L., González, I., García, T. *et al.* 2008. *Food Control*, 19, 1-8.
53. Baumgartner, S., Steiner, I., Kloiber, S. *et al.* 2002. *Eur Food Res Technol*, 214, 168-170.
54. Immer, U., Dupont, A., Giovannacci, I. *et al.* 2003. *Bull Liaison CTSCCV*, 13(4), 17-20.
55. Deibel, K., Trautman, T., DeBoom, T. *et al.* 1997. *J Food Prot*, 60(4), 436-441.
56. Ermolli, M., Prospero, A., Balla, B. *et al.* 2006. *Food Addit Contam*, 23, 876-882.
57. Fantozzi, A., Ermolli, M., Marini, M. *et al.* 2007. *J Agric Food Chem*, 55, 1071-1076.
58. Terry, C.F., Harris, N. & Parkes, H.C. 2002. *J AOAC Int*, 85, 768-774.
59. Dombink-Kurtzman, M.A., Dvorak, T.J., Barron, M.E. *et al.* 2000. *J Agr Food Chem*, 48, 5781-5786.
60. Bressani, R., Turcios, J.C., Colmenares de Ruiz, A.S. *et al.* 2004. *J Agric Food Chem*, 52, 1157-1162.
61. Van den Bulcke, M., De Schrijver, A., De Bernardi, D. *et al.* 2007. *Eur Food Res Technol*, 225, 49-57.
62. Díaz, C., Fernandez, C., McDonald, R. *et al.* 2002. *J AOAC Int*, 85, 1070-1076.
63. Hupfer, C., Hoztel, H., Sachse, K. *et al.* 1998. *Food Res Technol*, 206, 203-207.
64. Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F. *et al.* 2001. *Eur Food Res Technol*, 212, 497-504.

65. Hurst, C.D., Knight, A. & Bruce, I.J. 1999. *Mol Breed*, 5, 579-586.
66. Greiner, R., Konietzny, U. & Villavicencio, A.L.C.H. 2005. *Food Control*, 16, 753-759.
67. Perferoen M. 1998. <http://www.epa.gov/oppbppd1/pesticides/biopesticides/pips/old/cry9c/der44258108a.htm>, 20/5/2008.
68. Lee, J.W., Kim, J.H., Oh, S.H. *et al.* 2008. *J Radiat Phys Chem*, 77, 352-356.
69. Martínez-Bustos, F., Martínez-Flores, H.E., Sanmartín-Martínez, E. *et al.* 2001. *J Sci Food Agric*, 81, 1455-1462.
70. Lee, T.C., Bailey, M.R., Sims, S.R. *et al.* 1995. Monsanto Tech Report MSL-13864, St. Louis. Study 94-01-39-09.
71. Batista, R., Nunes, B., Carmo, M., *et al.* 2005. *J Allergy Clin Immunol*, 116, 403-410.
72. Huber, H.E. & Lüthy, P. 1981. En: *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*, págs. 209-234. Davidson, E.W. (Ed.), Allanheld, Osmun Publishers, Nueva Jersey, EE. UU.
73. Clark, B.W., Phillips, T.A. & Coats, J.R. 2005. *J Agr Food Chem*, 53, 4643-4653.
74. Chowdhury, E.H., Kuribara, H., Hino, A. *et al.* 2003a. *J Anim Sci*, 81, 2546-2551.
75. Chowdhury, E.H., Shimada, N., Murata, H. *et al.* 2003b. *Vet Hum Toxicol*, 45, 72-75.
76. Okunuki, H., Teshima, R., Shigeta, T. *et al.* J. 2002. *J Food Hyg Soc Japan*, 43, 68-73.
77. Nakajima, O., Teshima, R., Takagi, K. *et al.* 2007. *Reg Toxicol Pharmacol*, 47, 90-95.
78. Lutz, B., Wiedemann, S., Einspanier, R. *et al.* 2005. *J Agric Food Chem*, 53, 1453-1456.