

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



**DESARROLLO DE CUATRO SISTEMAS DE PCR CUANTITATIVA
EN TIEMPO-REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE ADN DE TRIGO, DE CEBADA Y DE
CENTENO EN ALIMENTOS “*SIN-GLUTEN*” PARA CELIACOS:
NUEVAS TÉCNICAS EN LA ANALÍTICA DEL GLUTEN**

JORGE RAÚL MUJICO FERNÁNDEZ



CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA (CSIC)
MADRID, 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

**DESARROLLO DE CUATRO SISTEMAS DE PCR CUANTITATIVA
EN TIEMPO-REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE ADN DE TRIGO, DE CEBADA Y DE
CENTENO EN ALIMENTOS “*SIN-GLUTEN*” PARA CELIACOS:
NUEVAS TÉCNICAS EN LA ANALÍTICA DEL GLUTEN**

Memoria presentada por:

JORGE RAÚL MUJICO FERNÁNDEZ

para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

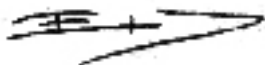
DIRECTOR:	Dr. Enrique Méndez Cormán Profesor de Investigación Centro Nacional de Biotecnología Consejo Superior de Investigaciones Científicas
TUTOR:	Dr. Jose Javier Tabera Galván Profesor Titular Departamento de Química-Física Aplicada Universidad Autónoma de Madrid
LUGAR DE REALIZACIÓN:	Unidad de Gluten Departamento de Estructura de Macromoléculas Centro Nacional de Biotecnología Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Don Enrique Méndez Cormán, Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid y Profesor de Investigación en el Centro Nacional de Biotecnología (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ministerio de Educación y Ciencia),

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**DESARROLLO DE CUATRO SISTEMAS DE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO-REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ADN DE TRIGO, DE CEBADA Y DE CENTENO EN ALIMENTOS “SIN-GLUTEN” PARA CELIACOS: NUEVAS TÉCNICAS EN LA ANALÍTICA DEL GLUTEN**”, que presenta Jorge Raúl Mujico Fernández para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ha sido realizada bajo mi dirección en el Centro Nacional de Biotecnología del CSIC.

Revisada la presente Tesis Doctoral, considero que tiene la debida calidad para su defensa y calificación.



Dr. Enrique Méndez Cormán
Profesor de Investigación del CSIC

Madrid, febrero de 2007

El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en la Unidad de Gluten (Departamento de Estructura de Macromoléculas) del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC-MEC) bajo la dirección del Dr. Enrique Méndez Cormán, gracias a una beca predoctoral del CSIC en el Programa I3P (convocatoria 2001), financiado por el Fondo Social Europeo, y al Proyecto PETRI titulado “Desarrollo de un kit de PCR en tiempo-real para la cuantificación de gluten vía ADN en alimentos para enfermos celíacos” (PTR1995-0778-OP), financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (Dic. 2005 – Jun. 2007)



CNB

CENTRO
NACIONAL DE
BIOTECNOLOGIA



CSIC

«A los hombres les encanta maravillarse.
Esto es la semilla de la ciencia.»

Ralph Waldo Emerson (1803-1882)

«Una teoría puede probarse mediante experimentos;
pero no hay ningún camino que conduzca
de los experimentos a la teoría.»

Albert Einstein (1879-1955)

«Las verdades que revela la ciencia
superan siempre a los sueños que destruye.»

Joseph-Ernest Renan (1823-1892)

A mi madre,
por todo su amor,
cariño y ternura

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral no es sólo fruto de mi esfuerzo, sino también del trabajo de un grupo de personas a las que desde estas líneas quisiera agradecer.

En primer lugar quiero dar las gracias a todos los profesores de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Madrid, por hacer de ésta una licenciatura (y también un doctorado) de calidad. Me gustaría hacer una mención especial a la Dra. María Fernández Lobato, quien me introdujo en el mundo de la investigación (gracias a una beca de colaboración del MEC) y, además de ser mi “jefa”, demostró ser una gran amiga en unos momentos difíciles para mí; y al Dr. Jose Javier Tabera Galván, por su labor como Tutor de Tesis y por su actitud siempre cordial y receptiva ante todas mis dudas y consultas.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Enrique Méndez Cormán. Primero, por haber creado la Unidad de Gluten. Segundo, por todo el esfuerzo invertido en mejorar la calidad de vida del colectivo celiaco. Tercero, por haber confiado en mí y por ofrecerme la oportunidad de trabajar en su grupo. Y, finalmente, por haber dirigido esta Tesis Doctoral.

También quiero agradecer la inestimable ayuda recibida del Dr. Miguel A. Viribay, Especialista de Aplicaciones de Biología Molecular de la empresa Applied Biosystems. Su ayuda y consejos técnicos sobre PCR cuantitativa en tiempo real han sido esenciales para la realización de una parte importante de este trabajo.

Gracias también a todos mis compañer@s del B16, a los de hoy (Alberto, Manuel, Joaquín, Kike, Esperanza, M^a Carmen, Cristina, Andrés y Carolina) y a los de ayer (Israel, Merche, Iván Serrano, Iván del Olmo, Sergio, Amparo, Noel...). Muchas gracias a todos por las sobremesas, las charlas entre experimento y experimento, las risas...

También me gustaría agradecer la labor de todas esas personas que muchas veces pasan desapercibidas, pero de las que todos nos aprovechamos cada día (personal de administración, secretaría, compras, bioinformática, reprografía, fotografía, cocina, limpieza...). Gracias por hacer nuestro trabajo mucho más fácil.

A mis amigos de “toda la vida”, Paco e Isaac. Gracias por estar siempre a mi lado y por aceptarme tal y como soy. A pesar de vernos poco en estos últimos años, cuando nos reunimos nos seguimos riendo como siempre. Y a Vanesa, mi mejor amiga y confidente. Gracias por todo el afecto que me has dado durante estos diez años de amistad. Eres la única persona que, con sólo verme, sabes perfectamente lo que siento...

También quiero dar las gracias a mis padres, Jorge y Amelia. Gracias de todo corazón por todo vuestro cariño, comprensión y apoyo incondicionales. Por la educación que me habéis dado, no sólo en el ámbito académico, sino también en el personal. Gran parte de lo que soy os lo debo a vosotros. Siempre seréis mis modelos a seguir. Gracias también a mis hermanos Alberto y Pablo, por ayudarme en todo momento y por mantenernos unidos en los momentos difíciles.

He dejado para el final (y no por casualidad...) a la persona más importante de mi vida. Gracias a tu apoyo, comprensión y amor he conseguido acabar esta Tesis Doctoral, que casi es tan tuya como mía. Como dijo Groucho Marx: "El mejor banquete del mundo no merece la pena ser comido a menos que se tenga a alguien con quien compartirlo". Afortunadamente, te tengo a ti, la persona más maravillosa y encantadora que he conocido nunca. Gracias por compartir tu vida conmigo y por hacerme sentir tan feliz...

Índice

Índice	xi
Capítulo I. Introducción	12
I.1. La enfermedad celiaca (EC).....	13
I.1.1. Generalidades.....	13
I.1.2. Factores implicados	14
I.1.3. Etiología	16
I.1.4. Manifestaciones clínicas	18
I.1.5. Diagnóstico	20
I.1.6. Aproximaciones terapéuticas.....	25
I.1.7. Tratamiento	29
I.1.8. Toxicidad de la avena	30
I.2. Métodos de detección/cuantificación de gluten en alimentos.....	31
I.2.1. Métodos de extracción de prolaminas	31
I.2.2. Métodos inmunológicos	32
I.2.3. Métodos no inmunológicos	35
I.3. Métodos de detección/cuantificación de ácidos nucleicos en alimentos	36
I.3.1. Extracción y purificación de ADN.....	36
I.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	38
I.3.3. Análisis cualitativo del ADN mediante PCR	41
I.3.4. Análisis cuantitativo del ADN mediante PCR.....	44

I.3.5. Aplicaciones de la PCR en la detección y/o cuantificación de ADN de trigo, cebada y centeno en alimentos	55
Capítulo II. Objetivos	59
Capítulo III. Materiales y Métodos	62
III.1. Muestras	63
III.1.1. Alimentos	63
III.1.2. Controles de especificidad	63
III.1.3. Variedades utilizadas en los estándares de ADN	64
III.1.4. Muestras de avena.....	65
III.1.5. Muestras de teff	65
III.2. Extracción del ADN de las muestras	65
III.2.1. Homogeneización	65
III.2.2. Métodos de extracción de ADN	66
III.3. Proceso de elaboración de los estándares de ADN de los cuatro sistemas de Q-PCR...	70
III.3.1. Extracción del ADN	70
III.3.2. Purificación de los extractos de ADN.....	72
III.3.3. Preparación de los estándares y las curvas de calibrado.....	73
III.4. <i>Primers</i> y sondas	75
III.5. PCR Cuantitativa en Tiempo-Real (Q-PCR).....	77

III.5.1. Reactivos	77
III.5.2. Fungible	80
III.5.3. Condiciones de amplificación.....	80
III.5.4. Controles.....	81
III.6. Análisis de los productos de amplificación	82
III.6.1. Curvas de disociación	82
III.6.2. Electroforesis en geles de agarosa.....	82
III.7. Técnicas inmunológicas de detección/cuantificación de gluten	85
III.7.1. Preparación del estándar de gliadinas.....	85
III.7.2. Extracción de prolaminas.....	85
III.7.3. Anticuerpos	87
III.7.4. Cuantificación de gluten mediante ELISA-R5 Sándwich (Valdes <i>et al.</i> , 2003)	87
III.7.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y Western Blot R5 (Valdes <i>et al.</i> , 2003).....	88
III.7.6. Análisis de alimentos “sin-gluten” mediante Espectrometría de Masas MALDI-TOF (Hernando <i>et al.</i> , 2003).....	90
Capítulo IV. Resultados y Discusión	92
IV.1. Desarrollo y optimización de un sistema cuantitativo de extracción de ADN en alimentos	93
IV.1.1. Estudio del método del CTAB (purificación con columnas).....	93

IV.1.2. Estudio comparativo de 3 métodos de extracción de ADN	95
IV.1.3. Optimización de las condiciones de extracción del método Wizard® sin fase de purificación	96
IV.1.4. Estudio de la purificación con columnas en el método Wizard®	103
IV.1.5. Estudio del rendimiento / efecto inhibitorio de los extractos del método Wizard® sin fase de purificación	104
IV.2. Diseño y optimización de los <i>primers</i>	106
IV.2.1. Selección de las secuencias específicas y diseño de los primers	106
IV.2.2. Optimización de las concentraciones de los <i>primers</i>	113
IV.3. Optimización de los soportes y reactivos de la Q-PCR	114
IV.3.1. Optimización de las placas y films adhesivos	114
IV.3.2. Optimización de la concentración de cloruro de magnesio	114
IV.4. Preparación de unos estándares basados en la mezcla o pool de los ADNs purificados a partir de distintas variedades de trigo, cebada y centeno	115
IV.4.1. Estudio de la variabilidad intraespecífica	115
IV.4.2. Preparación de los estándares de ADN	117
IV.5. Puesta a punto de un sistema de tinción de geles de agarosa más sensible que el bromuro de etidio	118
IV.6. Desarrollo y optimización de 4 sistemas de Q-PCR para la rápida detección y cuantificación (individual o simultánea) de ADN de trigo, cebada y centeno	120
IV.6.1. Sistema individual de Q-PCR de trigo	122

IV.6.2. Sistema individual de Q-PCR de cebada	132
IV.6.3. Sistema individual de Q-PCR de centeno	137
IV.6.4. Sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno	142
IV.6.5. Estudio comparativo entre los sistemas individuales (Q-PCR _{Tr} , Q-PCR _{Cb} y Q-PCR _{Cn}) y el sistema simultáneo (Q-PCR _{TCC}) de cuantificación de ADN de trigo, cebada y centeno	152
IV.7. Análisis de alimentos.....	155
IV.7.1. Alimentos dietéticos para enfermos celíacos.....	157
IV.7.2. Harinas y alimentos tratados con calor.....	157
IV.7.3. Alimentos basados en almidón de trigo.....	157
IV.7.4. Alimentos de avena.....	158
IV.7.5. Alimentos en los que el gluten se encuentra parcial o totalmente hidrolizado	163
IV.7.6. Alimentos “sin-gluten” basados en el teff.....	167
IV.7.7. Confirmación de los niveles de prolaminas mediante técnicas alternativas (Q-PCR, <i>Western Blot</i> y EM MALDI-TOF).....	169
IV.8. Estudio del efecto del calor sobre el contenido de prolaminas y ADN en los alimentos “sin-gluten”.....	171
IV.9. Desarrollo y optimización de un sistema de Q-PCR de trigo basado en sondas TaqMan®	173
IV.9.1. Diseño y optimización de los <i>primers</i> y la sonda TaqMan®	173
IV.9.2. Especificidad del sistema	175

IV.9.3. Elaboración de la curva estándar de ADN de trigo.....	176
IV.9.4. Estudio del efecto inhibitorio de los extractos del método Wizard [®] sin fase de purificación sobre el sistema TaqMan [®] de Q-PCR de trigo	177
IV.9.5. Comparación de los sistemas de SYBR [®] Green I y sondas TaqMan [®]	179
IV.10. Desarrollo y optimización de un sistema “ <i>home-made</i> ” de reactivos de q-pcr.....	180
IV.10.1. Adición de aditivos/adyuvantes	180
IV.10.2. Optimización de la concentración de SYBR [®] Green I	181
IV.10.3. Optimización de la concentración de MgCl ₂	181
IV.10.4. Amplificación del ADN purificado de la variedad de trigo duro <i>Aldeano</i>	181
IV.10.5. Estabilidad del sistema “ <i>home-made</i> ” de reactivos de Q-PCR	183
Capítulo V. Conclusiones	185
Capítulo VI. Bibliografía.....	189

Resumen / Abstract

La Enfermedad Celiaca (EC) es una intolerancia al gluten de carácter permanente, cuyo único tratamiento es una dieta de por vida con alimentos que no contengan gluten de trigo, de cebada y de centeno. Convencionalmente, para cuantificar el gluten en los alimentos para celíacos se han venido utilizado métodos inmunológicos (tipo ELISA o Western Blot) y, ocasionalmente, no-inmunológicos (como la Espectrometría de Masas MALDI-TOF).

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado por primera vez cuatro sistemas no-inmunológicos de detección y cuantificación (individual o simultánea) de ADN de trigo, cebada y centeno en alimentos “sin-gluten”, basados en la PCR cuantitativa en tiempo-real (Q-PCR) y el SYBR® Green I. Las sensibilidades de detección de ADN de estos sistemas son similares a la del método de ELISA-R5. Los cuatro sistemas de Q-PCR utilizan un sistema que se ha optimizado para la extracción de ADN en alimentos, basado en el método Wizard®, pero más rápido, con un mayor *rendimiento* y de una *pureza* suficiente que evitar un paso posterior de purificación.

A diferencia de los métodos de detección de gluten ya existentes, los tres sistemas individuales de Q-PCR permiten por primera vez diferenciar directamente si el tipo de contaminación es de trigo, de cebada o de centeno. El sistema simultáneo de Q-PCR, en función de la Temperatura de Melting, solo discrimina si las contaminaciones son bien de trigo/cebada o de centeno. Una de las ventajas del sistema simultáneo de Q-PCR es que el valor de ADN que se obtiene es prácticamente idéntico a la suma de los valores de ADN cuantificados con los sistemas individuales. Esto representa una gran ventaja para el sistema simultáneo, ya que en alimentos contaminados con mezclas de estos tres cereales, con un único análisis, se evita la necesidad de realizar los tres sistemas individuales. Otra ventaja es que en los alimentos no tratados con calor existe una gran linealidad entre los niveles de ADN (cuantificados con el sistema simultáneo) y los niveles de prolaminas (obtenidos con el método de ELISA-R5). Esta linealidad es menos acusada en el caso de los alimentos tratados con calor, donde el ADN suele estar parcialmente degradado y/o fragmentado. Por motivos similares, los cuatro sistemas de Q-PCR tienen la desventaja de ser insensibles en aquellos alimentos donde el ADN suele estar muy hidrolizado (cervezas, siropes, extractos de malta, cereales para el desayuno...).

Para la realización de esta Tesis Doctoral se han analizado cientos de alimentos “sin-gluten” con los sistemas desarrollados de Q-PCR y confirmando los datos con las técnicas de ELISA-R5, Western Blot y/o EM MALDI-TOF. En conclusión los sistemas desarrollados de Q-PCR pueden servir como nuevas herramientas no-inmunológicas para la confirmación “vía ADN” de la presencia de trigo, cebada y/o centeno en alimentos “sin-gluten”.

Celiac disease (CD) is defined as a permanent gluten intolerance, whose only treatment is a lifelong diet based on food products without gluten of wheat, barley and rye. Immunological (like ELISA or Western Blot) and non-immunological methods (like MALDI-TOF Mass Spectrometry) have been conventionally used to quantify gluten in food for celiacs. Four non-immunological systems for the (individual and simultaneous) detection and quantification of wheat, barley and rye DNA in food for celiacs, based on the quantitative real-time PCR (Q-PCR) and the SYBR[®] Green I, have been developed and optimised in the research for this Doctoral Thesis. The detection sensibilities of these systems are similar to the R5-ELISA method. An optimised food DNA extraction procedure based on the Wizard[®] method, but faster, with a higher yield and enough purity to avoid an additional purification step, is used by the four Q-PCR systems.

Unlike the already existing gluten detection methods, the three individual Q-PCR systems directly allow for the first time to determine if the contamination comes from wheat, barley or rye. Nevertheless, the simultaneous Q-PCR system only discriminates wheat/barley from rye contamination by the Melting Temperature of the amplification products. One of the advantages of the simultaneous Q-PCR system is that the calculated DNA value is practically identical to the total amount of DNA quantified with the individual systems. This represents a great advantage of the simultaneous system, since in food contaminated with mixtures of these three grains, and with a single analysis, the need to use the three individual systems is avoided. Another advantage is the great linearity observed in the non heat-treated food samples, between DNA (quantified with the simultaneous system) and gluten levels (obtained with the R5-ELISA method). In case of the heat-treated food samples, where DNA usually be partially degraded and/or fragmented, the linearity is less accurate. For similar reasons, the four Q-PCR systems have the disadvantage of being insensitive to food where the DNA usually be very hydrolysed (as beers, syrups, malt extracts, breakfast cereals...).

In the research for this Doctoral Thesis, hundreds of food samples for celiacs have been simultaneously analysed by DNA (Q-PCR) and protein techniques (R5-ELISA, Western Blot and MALDI-TOF MS). We can conclude that the developed Q-PCR systems can be used as new non-immunological tools in order to confirm, by the "DNA pathway", the presence of wheat, barley and/or rye in food for celiacs.

Abreviaturas

AAE	Anticuerpos AntiEndomisio
AAG	Anticuerpos AntiGliadinas
AAR	Anticuerpos AntiReticulina
AAV	Anticuerpos AntiYeyuno
AcM	Anticuerpo Monoclonal
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
ADN_{ds}	ADN de doble cadena (del inglés, <i>double-stranded</i>)
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos (del inglés, <i>Association of Official Analytical Chemist</i>)
AOECS	Federación de Asociaciones de Celiacos de Europa (del inglés, <i>Association Of European Coeliac Societies</i>)
APC	Célula Presentadora de Antígenos (del inglés, <i>Antigen Presenting Cell</i>)
ARN	Ácido ácido
ARN_m	ARN Mensajero
ARN_r	ARN Ribosomal
BSA	Albúmina de Suero Bovino (del ingles, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAM	Comunidad Autónoma de Madrid
Cb	Cebada
Cn	Centeno
CRM	Material de Referencia Certificado (del ingles, <i>Certified Reference Material</i>)

CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas
C_T	Número de ciclos que tarda la curva de amplificación en atravesar el umbral de detección (del inglés, <i>Cycle Threshold</i>)
CTAB	Bromuro de CetilTrimetilAmonio (del inglés, <i>CetylTrimethylAmmonium Bromide</i>)
CV	Coefficiente de Variación
Da	Dalton
dATP	DesoxiAdenosín TriFosfato (del inglés, <i>DeoxyAdenosine TriPhosphate</i>)
DCP	Dipeptidil CarboxiPeptidasa
dCTP	DesoxiCitidín TriFosfato (del inglés, <i>DeoxyCytidine TriPhosphate</i>)
DE	Desviación Estándar
dGTP	DesoxiGuanosín TriFosfato (del inglés, <i>DeoxyGuanosine TriPhosphate</i>)
DMSO	DiMetilSulfÓxido
dNTP	DesoxiNucleósidos TriFosfato (del inglés, <i>DeoxyNucleoside TriPhosphate</i>)
DPP	DiPeptidil Peptidasa
dUTP	DesoxiUridín TriFosfato (del inglés, <i>DeoxyUridine TriPhosphate</i>)
EC	Enfermedad Celiaca
ECL	Reactivo de detección para <i>Wester Blot</i> (del inglés, <i>Enhanced ChemiLuminescence</i>)
EDTA	Ácido EtilenDiaminoTetraacético (del inglés, <i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>)
EEG	Estándar Europeo de Gliadinas

EIA / RIA	InmunoEnsayo con Enzima / InmunoEnsayo con Radioisótopos (del inglés, <i>Enzyme Immuno-Assay / Radio Immuno-Assay</i>)
ELISA	Ensayo de InmunoabSorción Ligado a Enzima (del inglés, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EM	Espectrometría de Masas
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
ESPGHAN	Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (del inglés, <i>European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i>)
FAO	Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (del inglés, <i>Food and Agriculture Organization of United Nations</i>)
fg	Femtogramos
FRET	Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (del inglés, <i>Fluorescent Resonance Energy Transfer</i>)
g	Gramo
Gli	Gliadinas
GMO	Organismo Modificado Genéticamente (del inglés, <i>Genetically Modified Organism</i>)
h	Horas
HLA	Antígenos de Leucocitos Humanos o Complejo Principal de Histocompatibilidad de Humanos (del inglés, <i>Human Leukocyte Antigens</i>)
HRP	Peroxidasa de Rábano (del inglés, <i>HorseRadish Peroxidase</i>)
IFI	InmunoFluorescencia Indirecta
IFN_γ	InterFeroN Gamma

IIM	Instituto de Investigaciones Marinas
IL	InterLeucina
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
kV	KiloVoltio
LIE	Linfocitos IntraEpiteliales
LOD	Límite De Detección (del inglés, <i>Limit Of Detection</i>)
LOQ	Límite De Cuantificación (del inglés, <i>Limit Of Quantification</i>)
MALDI-TOF	Tiempo de Vuelo con Desorción e Ionización con Láser Asistida por Matriz (del inglés, <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i>)
MEC	Ministerio de Educación y Ciencia
mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Mililitro
Mpb	Mega pares de bases
MSC	Ministerio de Sanidad y Consumo
MW	Marcador de Peso Molecular (del inglés, <i>Molecular Weight</i>)
NCV	Asociación de Celiacos de Holanda
ND	No Determinado

ng	Nanogramos
ns	Nanosegundos
NTC	Control negativo de la PCR: sólo reactivos de amplificación, sin ADN molde (del inglés, <i>No Template Control</i>)
NTS	Espacio No Transcrito (del inglés, <i>Non-Transcribed Spacer</i>)
ODGP	Detergente octil- β -D-1-tioglucopiranósido
OD_x	Densidad Óptica a X nanómetros (del inglés, <i>Optical Density</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEP	Propil EndoPeptidasa
pg	Picogramos
ppm	Partes Por Millón
PVDF	Fluoruro de PoliVinilideno (del inglés, <i>PolyVinylidene Fluoride</i>)
PVP	PoliVinilPirrolidona
PWG	Grupo de Trabajo sobre el Análisis y la Toxicidad de las Prolaminas (del inglés, <i>Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity</i>)
Q-PCR	PCR Cuantitativa en Tiempo-Real (del inglés, <i>Quantitative Real-Time PCR</i>)
Q-PCR_x	Sistema de Q-PCR para la detección/cuantificación del ADN del cereal X (Tr: Trigo; Cb: Cebada; Cn: Centeno; TCC: Trigo/Cebada/Centeno)

QC-PCR	PCR Cuantitativa Competitiva (del inglés, <i>Quantitative Competitive PCR</i>)
rcf	Fuerza Centrifuga Relativa (del inglés, <i>Relative Centrifugal Force</i>)
RDA	Cantidad Diaria Recomendada (del inglés, <i>Recommended Diary Allowances</i>)
rpm	Revoluciones/vueltas Por Minuto
RT-iPCR	Inmuno-PCR en Tiempo-Real (del inglés, <i>Real-Time Immuno-PCR</i>)
SDS	Dodecil Sulfato Sódico o laurilsulfato sódico (del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de PoliAcrilamida y Dodecil Sulfato Sódico (del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
seg	Segundos
TAE	Tris-Acético-EDTA
TBE	Tris-Bórico-EDTA
TCC	Trigo/Cebada/Centeno
TGt	TransGlutaminasa Tisular
T_m	Temperatura de <i>melting</i> , disociación o fusión
TMB	3', 3', 5', 5' TetraMetil Benzidina (del inglés, <i>TetraMethyl Benzidine</i>)
TNE	TRIS-NaCl-EDTA
Tr	Trigo
TRIS	Nombre común del Tris-hidroximetil-aminometano
Tw	Tween [®] 20

UF	Unidades de Fluorescencia
UG	Unidad de Gluten
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
WHO	Organización Mundial de la Salud (del inglés, <i>World Health Organization</i>)
w/v	Peso/volumen (del inglés, <i>weight/volume</i>)
w/w	Peso/peso (del inglés, <i>weight/weight</i>)
µg	Microgramo
µl	Microlitro

Capítulo I. Introducción

I.1. LA ENFERMEDAD CELIACA (EC)

I.1.1. Generalidades

La **Enfermedad Celiaca (EC)** o intolerancia al **gluten** es una enteropatía crónica de base autoinmune, que afecta a individuos (tanto niños como adultos) *genéticamente predispuestos*, los cuáles rechazan la ingesta de gluten presente en el **trigo**, la **cebada** y el **centeno** (la relación con la avena está actualmente en discusión). En un celiaco, la ingesta de gluten provoca una lesión severa de la mucosa intestinal, que se caracteriza histológicamente por una hiperplasia de criptas con atrofia total o subtotal de las vellosidades intestinales. Como consecuencia de ese daño, los nutrientes no son absorbidos, lo que provoca anemia, desnutrición, diarrea, dolor de huesos, fatiga y retraso del crecimiento. La eliminación del gluten de la dieta permite la recuperación de la mucosa intestinal y, por lo tanto, la recuperación clínica completa.

La enfermedad es de carácter permanente y el intestino se ve dañado inevitablemente cada vez que se consume gluten, al margen de si se manifiestan síntomas o no. La sensibilidad al gluten puede variar de un enfermo a otro. En la actualidad, el único tratamiento es una dieta estricta (y de por vida) con alimentos exentos de trigo, cebada y centeno. De aquí la inquietud plenamente justificada de los enfermos celiacos por saber con exactitud la presencia de gluten en los alimentos, ya que de una dieta “sin-gluten” depende su salud.

La EC se presenta casi exclusivamente en sujetos de raza blanca, habiendo sido descrita (principalmente) en Europa, América y Australia. Dentro de estas áreas afectadas, la frecuencia varía ampliamente, aunque es muy probable que esta frecuencia esté infravalorada por la existencia de formas con un único o con pocos síntomas, que pasan desapercibidas.

La EC es la enfermedad crónica gastrointestinal más frecuente. Se estima que la prevalencia de esta enfermedad en nuestro país es aproximadamente **1 de cada 100 ó 200 personas**, calculándose que existen alrededor de **150.000-200.000** celiacos en España. La proporción de enfermos entre ambos sexos no es la misma: se da con mayor frecuencia en mujeres que en hombres; de hecho, se calcula que siete de cada diez enfermos celiacos son mujeres.

I.1.2. Factores implicados

Existen una serie de factores que influyen en el desarrollo de la EC. Entre ellos encontramos:

I.1.2.1. El gluten

No fue hasta el año 1950 cuando el pediatra holandés *Willem K. Dicke* relacionó por primera vez la ingesta de harinas de **trigo** con el desencadenamiento de la EC, y en años posteriores, en colaboración con los bioquímicos *Weijers* y *Van de Kamer*, demostró que la acción tóxica de la harina de trigo iba ligada a la fracción proteica insoluble en agua: el **gluten**.

El gluten está compuesto por dos grupos de proteínas: las *prolaminas* y las *glutelinas*. Ambos grupos de proteínas poseen un alto contenido de los aminoácidos prolina y glutamina. En la actualidad, la proporción entre ambas fracciones (prolaminas:glutelinas) está en discusión (*Wieser*, 2007).

Las *prolaminas* son un grupo amplio de proteínas con propiedades similares, solubles en 60% etanol, de cadena simple y con un peso molecular entre 30 y 60 kDa. En función de la *movilidad electroforética*, las prolaminas se clasifican en alfa (α), beta (β), gamma (γ) y omega (ω) (*Macritchie & Lafiandra*, 1997). Las $\alpha/\beta/\gamma$ -prolaminas contienen grupos $-SH$, mientras que las ω -prolaminas no. Por otro lado, las *glutelinas* son un grupo de proteínas altamente heterogéneo, solubles en ácido diluido (*Payne et al.*, 1979). Las moléculas de glutelinas están formadas por subunidades, las cuales están unidas a través de puentes disulfuro. Estas subunidades han sido subdivididas en dos grupos principales, de acuerdo a su movilidad electroforética (*Bietz et al.*, 1975): glutelinas de alto peso molecular (80-120 kDa) y glutelinas de bajo peso molecular (30-45 kDa) (*Payne et al.*, 1979; *Southan & MacRitchie*, 1999).

Hoy en día sabemos que además del trigo están implicados otros cereales, como la **cebada** y el **centeno**, y que las *prolaminas* son el componente tóxico principal, recibiendo para cada cereal un nombre específico: *gliadinas* si provienen del trigo, *hordeínas* si provienen de la cebada y *secalinas* si provienen del centeno. El porcentaje de prolaminas varía dependiendo del cereal (**Tabla I.1**).

Tabla I.1 Contenido en prolaminas (expresado como % del total de proteínas) de los principales cereales.

Cereales	Prolamina	Contenido (%)
<i>Trigo</i>	Gliadina	69
<i>Centeno</i>	Secalina	30-50
<i>Cebada</i>	Hordeína	46-52
<i>Avena</i>	Avenina	16
<i>Maíz</i>	Zeína	55
<i>Arroz</i>	Orzenina	5

Aunque las *prolaminas* son el componente tóxico principal para los enfermos celíacos, existen algunos estudios que sugieren una posible toxicidad de las *gluteninas* (o glutelinas del trigo). Diversos estudios han demostrado que las gluteninas son capaces de estimular los linfocitos T (van de Wal *et al.*, 1999; Vader *et al.*, 2002b; Molberg *et al.*, 2003; Spaenij-Dekking *et al.*, 2005b). Recientemente, se ha estudiado la toxicidad *in vivo* de las gluteninas de alto peso molecular (Dewar *et al.*, 2006). En los 3 pacientes celíacos estudiados, las gluteninas provocaron ligeros cambios en la histología del intestino delgado, así como un aumento en los niveles de interleucina 15 (IL-15). Sin embargo, estos resultados no son concluyentes, por dos motivos: el número de pacientes estudiado es muy pequeño (n=3) y no se utilizaron controles con pacientes sanos.

I.1.2.2. Factores genéticos implicados en el desarrollo de la EC

Al igual que otras afecciones de base autoinmune, la EC presenta una fuerte asociación con determinadas variantes (alelos) de las moléculas del *Sistema de Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA)* de clase II (Sollid & Thorsby, 1993). Estas moléculas son glicoproteínas que se encuentran presentes en la membrana plasmática formando heterodímeros [unión no covalente de una cadena alfa (α) y otra beta (β)]. Todos los estudios realizados a nivel molecular indican que la susceptibilidad de la EC está asociada a los heterodímeros **DQ2** y **DQ8** (Spurkland *et al.*, 1990; Lundin *et al.*, 1993; Sollid & Thorsby, 1993; Fernandez-Arquero *et al.*, 1998; Polvi *et al.*, 1998). El heterodímero **DQ2** (**DQA1*0501-DQB1*0201**) se encuentra presente en más del 95% de los pacientes, pero sólo el 2% de los individuos DQ2 desarrolla una EC (Marsh, 1992; Peña *et al.*, 1998).

La homocigosis del alelo DQB1*0201 también potencia la susceptibilidad a la EC (Ploski *et al.*, 1993; Arranz *et al.*, 1997; Balas *et al.*, 1997). El heterodímero **DQ8** (DQA1*0301-DQB1*0302) también predispone a la enfermedad, pero es menos frecuente, encontrándose en el 5% de los pacientes. La presencia de uno de estos heterodímeros (**DQ2** o **DQ8**) es necesaria para la manifestación de la susceptibilidad a la EC (Lundin *et al.*, 1990; Lundin *et al.*, 1994; van de Wal *et al.*, 1998b; Van De Wal *et al.*, 2000).

También existen varias regiones fuera del HLA en las que se ha demostrado alguna relación con la EC. Sin embargo, no todos los enfermos celíacos comparten los alelos de riesgo y no todos los individuos portadores de dichos alelos desarrollan la EC. Por ello, deben existir otros genes de susceptibilidad implicados y todavía no identificados (Marsh, 1992).

I.1.2.3. Factores ambientales implicados en el desarrollo de la EC

El análisis de los datos clínicos ha llevado a la conclusión de que determinados procesos ambientales, como pueden ser la introducción precoz del gluten en la dieta y las infecciones intestinales, pueden influir en el inicio de la EC.

I.1.3. Etiología

Las *gliadinas* (Gli) son sometidas a un gran número de modificaciones antes de llegar a la región intestinal, en donde inducen (en pacientes sensibles) la enfermedad celíaca. Estas modificaciones incluyen reacciones de agregación y desagregación, reacciones *redox*, rupturas proteolíticas de los enlaces peptídicos (*hidrólisis*), reacciones de desamidación/transamidación...

La primera modificación *in vivo* ocurre en el estómago. El papel de los jugos gástricos en la desamidación de las Gli no está muy claro (Sjostrom *et al.*, 1998; van de Wal *et al.*, 1998a). No sólo la concentración de ácido clorhídrico (HCl), sino también la duración de la digestión, parecen jugar un papel importante. En los enfermos celíacos, las Gli afectan a la duración del vaciado gástrico (Benini *et al.*, 2001). Después del paso de los péptidos de Gli por el estómago, estos alcanzan el intestino delgado (**Figura I.1**).

En los enfermos celíacos, la capacidad proteolítica del intestino delgado se encuentra menguada y las Gli no se digieren por completo, dando lugar al péptido resistente 33-mer, que contiene varios epítomos tóxicos con capacidad inmunoestimulante (Shan *et al.*, 2002). El 33-mer atraviesa el epitelio intestinal y la lámina propia a través de determinadas rutas transcelulares /

paracelulares reguladas por los niveles de *zonulina* (proteína que favorece de manera transitoria la permeabilidad de los tejidos epiteliales). La *transglutaminasa tisular (TGt)*, expresada principalmente en las células mesenquimales de la región subepitelial de la mucosa intestinal, desamida los residuos de glutamina de los epítomos tóxicos y los convierte en ácido glutámico (Dieterich *et al.*, 1997; Molberg *et al.*, 1998; Sjostrom *et al.*, 1998). En comparación con la desamidación ácida, que se sospecha puede ser inespecífica, la reacción de desamidación catalizada por la TGt requiere de secuencias específicas de aminoácidos (Vader *et al.*, 2002a). Los péptidos de Gli también pueden ser transamidados por la propia TGt y, probablemente, por otras moléculas semejantes. Estas enzimas unen covalentemente péptidos de Gli a aceptores de acilos, vía residuos de glutamina. En la actualidad se desconoce la importancia de la transamidación en la patogenia de la enfermedad celiaca. Sin embargo, se sabe que esta reacción induce la formación de autoanticuerpos (Sollid *et al.*, 1997; Uhlig *et al.*, 1998).

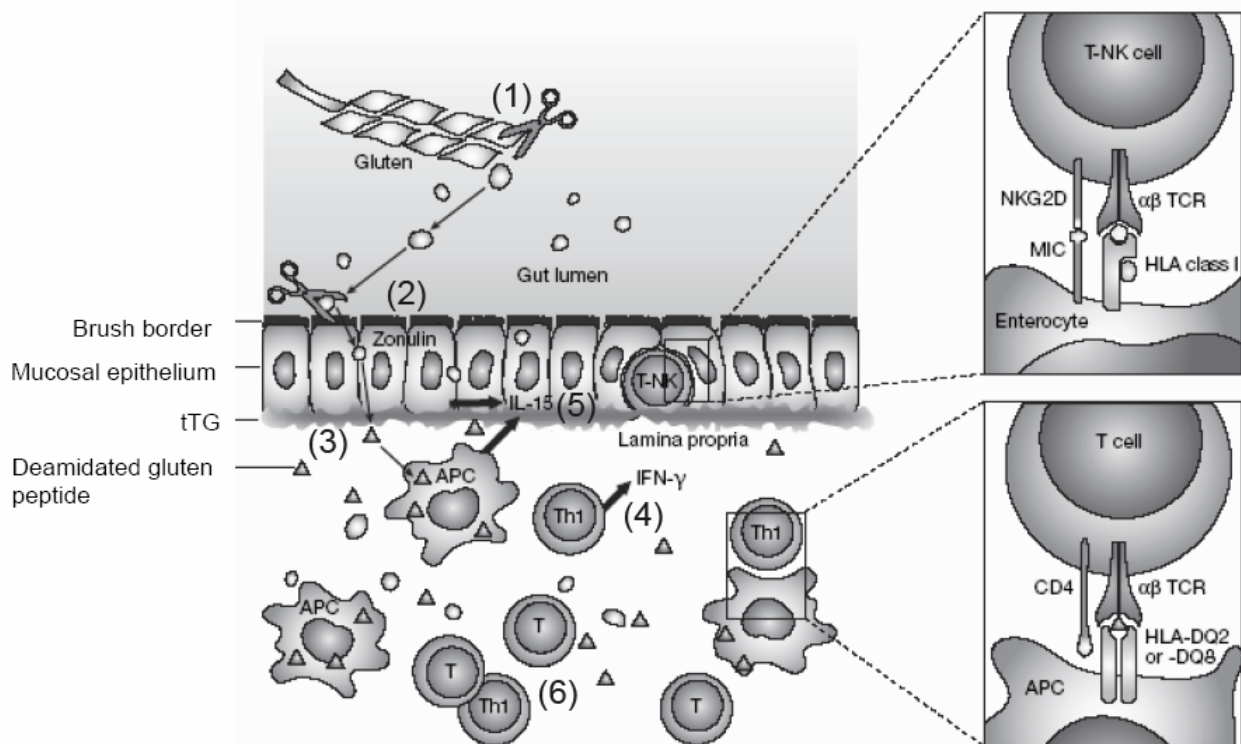


Figura I.1 Esquema hipotético de las interacciones entre las proteínas del gluten y el sistema inmunológico de un enfermo celiaco.

Los linfocitos T CD4+ de la lámina propia reconocen predominantemente los péptidos desamidados, presentados por los receptores HLA-DQ2/8 localizados en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APCs). De esta forma, los linfocitos T son activados y la secreción de diversas citoquinas (como, por ejemplo, el interferón γ o IFN γ) acaba provocando la

lesión del epitelio intestinal, caracterizada por una hiperplasia de las criptas y una atrofia vellositaria (Anderson *et al.*, 2000; Arentz-Hansen *et al.*, 2000). La interleucina 15 (IL15) es el principal mediador de la respuesta inmune innata en la enfermedad celiaca: un péptido derivado de la α -gliadina (31-49) provoca, mediante una ruta que implica a la IL15, la expresión de las moléculas MIC en la superficie de las células epiteliales del intestino. Los linfocitos T, infiltrados a través del epitelio intestinal, reaccionan con MIC a través de sus receptores NKG2D, provocando una respuesta citotóxica.

I.1.4. Manifestaciones clínicas

El inicio de la EC suele producirse en el niño entre el primer y tercer año de vida, tras la introducción del gluten en la dieta. Los síntomas varían considerablemente en función de la edad de introducción del gluten, del momento de aparición de las manifestaciones clínicas y de otros factores no identificados actualmente.

La existencia de diferentes formas clínicas sintomáticas y asintomáticas dio lugar a la representación gráfica de la EC propuesta por Catáis, denominada “*Iceberg* de la Enfermedad Celiaca” (**Figura I.2**). La parte visible del *Iceberg* estaría representada por la **EC Sintomática**. Los síntomas de la EC pueden ser muchos y muy variados, con lo que es, *a priori*, difícil de diagnosticar. Junto a las *formas clásicas* o *típicas* de presentación de la EC (diarrea crónica, distensión abdominal y retraso en el crecimiento), existen otras formas de menor expresividad clínica: son las *formas monosintomáticas* o *atípicas*, cuya frecuencia en algunos países como Finlandia sobrepasan incluso la frecuencia de las formas clásicas (Maki *et al.*, 1988).

En la edad pediátrica, la *forma atípica* más frecuente es la talla corta sin manifestaciones digestivas (de Lecea *et al.*, 1996). También se han descrito retrasos en la pubertad, que en la edad adulta y especialmente en la mujer, tendrían su equivalente en infertilidad, abortos de repetición, alteraciones del metabolismo del calcio/fósforo con osteopenia-osteoporosis, artritis, miopatía... (Holmes, 1996). Recientemente se han descrito pacientes con hipertransaminasemia, especialmente adultos, con hallazgos histológicos inespecíficos. También se ha observado en los últimos años, casos esporádicos de epilepsias refractarias al tratamiento anticonvulsivo, con presencia de calcificaciones intracraneales y respuesta clínica favorable a la exclusión del gluten de la dieta (Ventura *et al.*, 1991). Odontólogos escandinavos fueron los primeros en detectar alteraciones del esmalte dental en pacientes celiacos no diagnosticados (y, por lo tanto, no tratados) (Maki *et al.*, 1988).

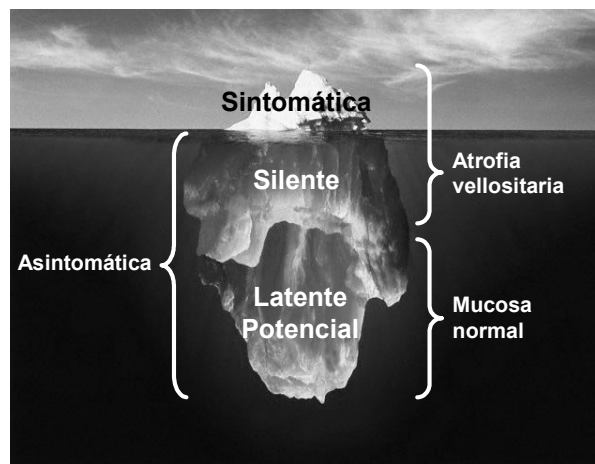


Figura I.2 Iceberg de la Enfermedad Celiaca (EC).

Además de estas formas clínicas sintomáticas, en los últimos 10 años la disponibilidad de marcadores inmunológicos de la EC ha puesto en evidencia la existencia de otras formas de presentación de la EC que se hallan por debajo de la parte visible del “*Iceberg* de la Enfermedad Celiaca” (**EC Asintomática**): **EC Silente**, **EC Latente** y **EC Potencial** (Ferguson *et al.*, 1993). Como estos celíacos son *asintomáticos*, la enfermedad suele evolucionar hacia otras complicaciones, muchas veces graves, que se atienden por otras especialidades médicas, sin que se establezca por ello un diagnóstico claro de la EC.

- La **EC Silente** se presenta sin síntomas ni signos de mal absorción, con serología positiva y aplanamiento vellositario de la mucosa del intestino delgado característica de la EC. Este tipo de EC fue detectada inicialmente en los grupos de familiares en primer grado de enfermos celíacos en los que, por la connotación genética de la enfermedad, se realizaba una vigilancia clínica mediante *marcadores serológicos* (Vitoria *et al.*, 1994). La evidencia de que ciertas enfermedades, fundamentalmente de base autoinmune, se asocian con mayor frecuencia a la EC (**Tabla I.2**), ha motivado la utilización de los *marcadores serológicos* como métodos de *screening* en estos grupos, observándose una proporción importante de EC Silentes en pacientes *Diabéticos Insulinodependientes* (Calero *et al.*, 1996) o con *Síndrome de Down* (Walker-Smith *et al.*, 1990).
- La **EC Latente** se aplica en aquellos individuos que llevando una dieta con gluten presentan una biopsia intestinal normal, pero que en algún momento han presentado una *atrofia subtotal de las vellosidades intestinales*, con las características histológicas propias de la EC.

- Existe otro grupo de pacientes, sin atrofia vellositaria, donde se detecta otras alteraciones, principalmente inmunológicas, características de la EC, como son los marcadores serológicos positivos o el aumento de linfocitos intraepiteliales. Para estos pacientes se propone el término de **EC Potencial**: aunque en ningún momento han presentado una lesión vellositaria característica, manifiestan alteraciones inmunológicas muy peculiares. Se especula que son individuos que potencialmente pueden desarrollar la EC, probablemente inducida por factores ambientales no identificados hasta el momento.

Tabla I.2 Enfermedades asociadas con la Enfermedad Celiaca (EC).

Asociación demostrada	Asociación probable	Asociación posible
<i>Dermatitis herpetiforme</i>	Enfermedad tiroidea autoinmune	Enfermedad de <i>Adison</i>
<i>Diabetes mellitus</i> (insulinodependiente)	Síndrome de <i>Sjögren</i>	Enfermedad inflamatoria intestinal
Síndrome de <i>Down</i>	Asma	Cirrosis biliar primaria
Déficit selectivo de IgA		Hepatitis autoinmune
		Artritis reumatoide
		Síndrome de <i>Turner</i>
		Anemia perniciosa

I.1.5. Diagnóstico

I.1.5.1. Biopsia

Según los criterios de la **ESPGHAN** (*European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*) la única forma de verificar con certeza si un paciente es o no celiaco es mediante la realización de una **biopsia intestinal** (Meeuwiss.Gw, 1970; Walker-Smith *et al.*, 1990). El *espectro de la sensibilidad al gluten* produce una serie de cambios en la mucosa intestinal del enfermo celiaco, desde un aumento en el número de *Linfocitos IntraEpiteliales* (*LIE*), hasta un patrón característico de atrofia de las vellosidades intestinales con hiperplasia de las criptas (**Figura I.3**). El aplanamiento de la superficie intestinal hace que disminuya el área de absorción de los alimentos, siendo la pérdida de esta superficie la que limitará el grado de los síntomas en cada individuo (Marsh, 1992).

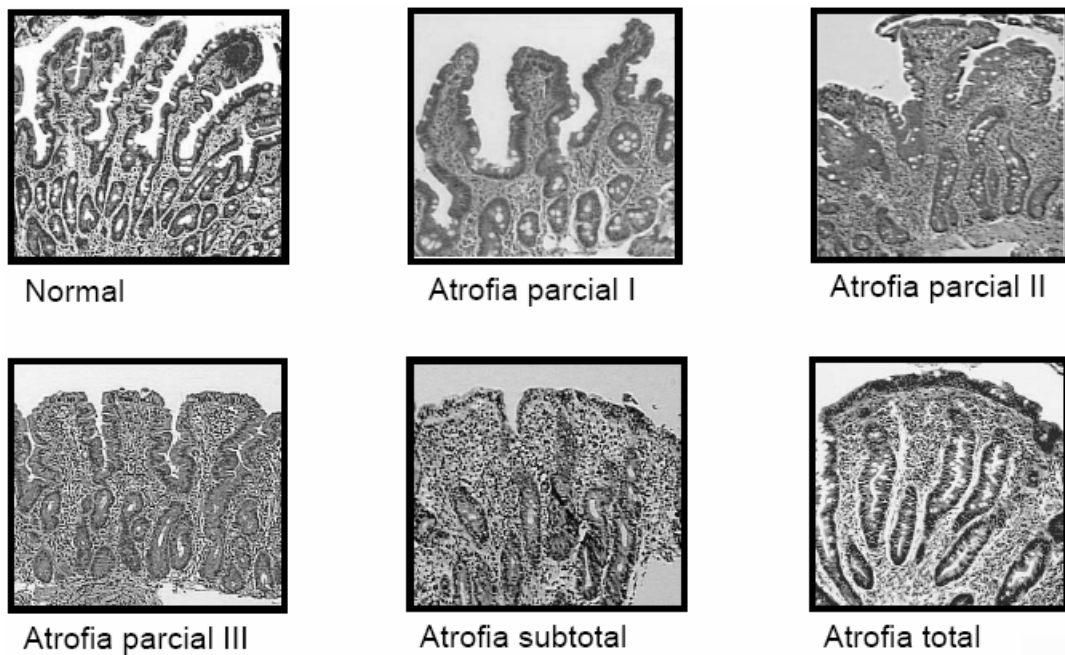


Figura I.3 Biopsia normal y con distintos grados de atrofia vellositaria de la mucosa del intestino delgado.

I.1.5.2. Marcadores serológicos

A diferencia de los pacientes sanos, los enfermos celíacos presentan un alto nivel de **marcadores serológicos** (anticuerpos) al ingerir alimentos que contienen prolaminas de trigo, cebada y/o centeno. Entre los marcadores serológicos de la EC destacaron inicialmente los *anticuerpos antigliadina* (AAG) y los *anticuerpos antiendomiso* (AAE), y en los últimos años, los anticuerpos *antitransglutaminasa* (anti-TGt).

Los ELISAs y las tiras inmunocromatográficas son las técnicas inmunológicas que hoy en día más se utilizan en la monitorización de los marcadores serológicos y el pre-diagnóstico de la EC. Estas técnicas van a servir de base para la realización de la biopsia intestinal y la confirmación definitiva sobre si un paciente es o no celíaco. Sin embargo, ninguna de estas técnicas tiene una especificidad y sensibilidad del 100%, por lo que, ante cualquier sospecha clínica debe realizarse siempre una biopsia intestinal.

I.1.5.2.1. Anticuerpos antigliadina

Son anticuerpos dirigidos contra las distintas subfracciones de las gliadinas. Aunque con menor frecuencia, también están elevados en otras enfermedades, por tanto, no se les puede atribuir un papel primario en la patogénesis de la EC. Pueden encontrarse elevados, por ejemplo, en enfermedades gastrointestinales como la enfermedad de Crohn (Ribes *et al.*, 1984), las intolerancias alimentarias, los síndromes de malabsorción, etc., y en enfermedades no gastrointestinales, como el eccema atópico, el pénfigo y el penfigoide, el síndrome de Sjögren, la artritis reumatoide, etc. Su presencia indica sensibilización al gluten, pero no necesariamente enteropatía.

La concentración de AAG no está homogéneamente distribuida; cambia con la edad y está influida por factores genéticos (Ribes *et al.*, 1984; Troncone & Ferguson, 1991). Para su determinación se han utilizado una gran diversidad de métodos, tanto comerciales como no comerciales propios de cada laboratorio, pero los más extendidos en su uso y los más fiables son los métodos de ELISA. La determinación mediante ELISA presenta la ventaja de que estos métodos son sencillos, baratos y evidenciables (Ribes *et al.*, 1984). El hecho de que se obtengan resultados cuantitativos con una sola determinación es una ventaja adicional dado que permite efectuar un seguimiento dinámico de este marcador a lo largo del tiempo y en función de los cambios dietéticos que se realicen.

Los AAG séricos son predominantemente de clase IgA e IgG; los IgM son de escasa utilidad por su baja sensibilidad y especificidad. Los IgG son de mayor sensibilidad, pero muy poco específicos, con un alto porcentaje de valores elevados en individuos no celíacos (falsos positivos). Los AAG de clase IgA son los de mayor especificidad, correlacionándose mejor con la presencia de enteropatía (Ribes *et al.*, 1984; Burgin-Wolff *et al.*, 1991; Troncone & Ferguson, 1991; Grodzinsky *et al.*, 1995); sin embargo, han caído en desuso debido a su baja sensibilidad (Rodrigo, 2006). Además, existe una gran variabilidad en la eficacia de los AAG, dependiendo de los tests empleados, de la población estudiada, así como del valor de corte o de referencia seleccionado. La diversidad de preparaciones antigénicas y la falta de uniformidad en la expresión de los resultados dificultan la comparación entre los diferentes estudios y grupos de investigación.

I.1.5.2.2. Marcadores tisulares

Posteriormente al descubrimiento de los AAG, se pusieron en evidencia, en los pacientes celíacos no tratados, otras respuestas humorales cuya detección requiere la utilización de un sustrato tisular. Se han evaluado por métodos de *inmunofluorescencia indirecta* (IFI). Son los anticuerpos *antirreticulina* (AAR), los anticuerpos *antiyeyuno* humano (AAY) y los anticuerpos *antiendomiso* (AAE).

Los AAR fueron descritos por primera vez en 1971 por Seah y colaboradores, quienes los determinaron sobre riñón, estómago e hígado de roedor, mediante IFI (Seah *et al.*, 1971). Se ha demostrado que el patrón específico AAR₁ identifica los mismos anticuerpos que los AAE, frente a sustratos antigénicos distintos (Maki *et al.*, 1984). Sin embargo, su sensibilidad y especificidad son más bajas que las de otros marcadores y su utilidad práctica es limitada; su principal problema radica en la lectura o la interpretación. Grupos como el de Mäkki, con amplia experiencia, obtienen resultados de sensibilidad y especificidad similar a los AAE (Maki *et al.*, 1984).

Los AAY se observan en secciones de yeyuno humano; son idénticos a los AAE, ya que al incubar los sueros con esófago de mono se absorben los AAY y al incubar los sueros con yeyuno humano se elimina la presencia de AAE. No aportan ninguna información adicional en la determinación de los AAR y de los AAE.

Los AAE fueron descritos por primera vez en 1984 por Chorzelski y colaboradores tras ser inicialmente identificados en pacientes con *dermatitis herpetiforme* (Chorzelski *et al.*, 1984). Dirigidos contra la sustancia intermiofibrilar del músculo liso (endomiso), no reaccionan contra otros órganos como riñón o hígado. Los AAE (preferentemente de clase IgA) se determinan por métodos de IFI sobre sección de esófago de mono o de cordón umbilical (Calabuig *et al.*, 1990; Kolho & Savilanti, 1997; Llanes *et al.*, 1997), usando diluciones seriadas de los sueros, con objeto de tener una valoración semicuantitativa, lo que encarece su determinación. Estos ensayos tienen una alta especificidad (97-100%) y sensibilidad (90-100%) (Rostom *et al.*, 2005), pero su interpretación es subjetiva (Maki, 1995).

I.1.5.2.3. Anticuerpos antitransglutaminasa

Recientemente, Dieterich y colaboradores han identificado la *transglutaminasa tisular* (TGt) como el autoantígeno de la enfermedad celíaca (Dieterich *et al.*, 1997), lo que ha propiciado el desarrollo de distintos métodos de ELISA que permiten determinar la presencia de anticuerpos

frente a este antígeno (Dieterich *et al.*, 1998; Sulkanen *et al.*, 1998). Diversos estudios posteriores han corroborado que los anticuerpos anti-TGt-IgA y los AAE-IgA son el mismo anticuerpo determinado frente a sustratos distintos (Troncone *et al.*, 1999; Molberg *et al.*, 2000).

Las ventajas metodológicas de la determinación de anticuerpos anti-TGt son las propias de los métodos enzimáticos; como ventaja adicional frente a los AAG, presentan una mayor especificidad y sensibilidad (Dickey *et al.*, 1997; Ribes *et al.*, 1999; Troncone *et al.*, 1999; Burgin-Wolff *et al.*, 2001; Agardh *et al.*, 2002). Aunque existe una pequeña variabilidad dependiendo de los tests empleados (Fernandez *et al.*, 2005), la mayoría de autores coinciden en una sensibilidad superior al 90% y una especificidad entorno al 95% (Rodrigo, 2006). Además, diversos estudios han demostrado que los niveles de anticuerpos anti-TGt correlacionan con el grado de atrofia vellositaria (Tursi *et al.*, 2003). La eficacia diagnóstica de los anticuerpos de clase IgG, de interés en los pacientes con déficit de IgA, ha sido poco estudiada hasta el momento, aunque resultados preliminares apuntan una baja especificidad (Dickey *et al.*, 1997; Burgin-Wolff *et al.*, 2001; Agardh *et al.*, 2002).

Los ensayos basados en la TGt suponen una excelente relación coste-eficiencia para el diagnóstico y *screening* de la EC, al asociarse la metodología de los AAG (menor coste y más sencilla) con la alta eficacia diagnóstica de los AAE (pero obviándose el uso del sustrato de una especie en peligro de extinción y la subjetividad de la inmunofluorescencia).

I.1.5.2.4. Tiras inmunocromatográficas

Como alternativa a los ensayos de ELISA, se han desarrollado varios *sistemas visuales* para la rápida detección de marcadores serológicos de la EC (Garrote *et al.*, 1999; Baldas *et al.*, 2000; Sorell *et al.*, 2002; Raivio *et al.*, 2006). En 2004, nuestro grupo desarrolló dos tipos de *tiras inmunocromatográficas* rápidas (Ferre *et al.*, 2004): unas tiras simples para detectar anticuerpos IgA/G contra la transglutaminasa tisular (TGt) y otras tiras dobles para detectar simultáneamente anticuerpos IgA contra TGt y gliadinas (AAG).

Con dichas tiras se analizaron los *sueros* de 172 enfermos celíacos, 140 controles (con mucosa normal) y 23 enfermos celíacos en remisión. Con las tiras simples TGt, se obtuvo una sensibilidad del 97,1% y una especificidad del 99,0% en el caso de los pacientes pediátricos, y una sensibilidad del 83,3% y una especificidad del 100,0% en el caso de pacientes adultos. Las tiras dobles TGt/AAG mostraron una sensibilidad del 95,7% y una especificidad del 99,0% para la TGt y una sensibilidad del 89,2% y una especificidad del 95,8% para la AAG en el caso de pacientes pediátricos, y una sensibilidad del 80,0% y una especificidad del 100,0% para la TGt y

una sensibilidad del 83,3% y una especificidad del 100,0% para la AAG en el caso de pacientes adultos. Los resultados fueron comparables a los obtenidos con los correspondientes métodos de ELISAs (Ferre *et al.*, 2004).

En la actualidad, se están desarrollando unas nuevas *tiras inmunocromatográficas* capaces de detectar estos mismos marcadores serológicos directamente en muestras de sangre.

I.1.6. Aproximaciones terapéuticas

Como aproximaciones terapéuticas de la enfermedad celiaca se han sugerido (**Figura I.1**): (1) la adición de propil endopeptidasas exógenas (PEP) para incrementar la hidrólisis de los péptidos tóxicos resistentes; (2) el bloqueo de los receptores de la zonulina; (3) el desarrollo de fármacos capaces de inhibir irreversiblemente la actividad de la TGt humana; (4) la administración de anticuerpos anti-IFN γ para frenar el efecto citotóxico de estas proteínas; (5) la neutralización de la IL15 para evitar la expresión de MIC y, por lo tanto, la respuesta citotóxica contra los enterocitos; y (6) la inhibición de la migración de los linfocitos T.

I.1.6.1. Uso de proteinasas bacterianas

I.1.6.1.1. Digestión de péptidos tóxicos derivados de gliadinas mediante el tratamiento con propil endopeptidasas (PEP)

Recientemente se han publicado las secuencias de varios epítotos tóxicos con capacidad inmunoestimulante (entre ellos, el 33-mer) presentes en las fracciones α y γ de las gliadinas (Shan *et al.*, 2002; Piper *et al.*, 2004). Estos epítotos tienen péptidos homólogos en todos los cereales considerados tóxicos y la mayoría de ellos presentan resistencia a la acción de las enzimas gástricas (tanto enzimas pancreáticas como enzimas del intestino delgado). Esta resistencia se debe a su estructura primaria (existencia de numerosos residuos de prolina).

La adición de dipeptidasas específicas de prolina (dipeptidil peptidasas o DPP; dipeptidil carboxipeptidasas o DCP) y de propil endopeptidasas (PEP) incrementan significativamente la hidrólisis de los péptidos tóxicos resistentes (tanto *in vitro* como *in vivo*) y su consiguiente pérdida de inmunogenicidad (Hausch *et al.*, 2002; Piper *et al.*, 2004). Estas enzimas degradan totalmente los péptidos tóxicos o generan péptidos de menor tamaño que pueden ser hidrolizados por las enzimas del intestino delgado. Su empleo podría compensar la baja

actividad de estas enzimas en el intestino delgado de los enfermos celíacos y eliminar la respuesta inflamatoria derivada de la ingesta de gluten.

El grupo del Dr. Khosla también ha analizado la actividad, especificidad y resistencia a ácidos y proteasas de distintas PEP bacterianas (*Flavobacterium meningosepticum*, *Shimgomonas capsulate* y *Myxococcus xanthus*) con respecto a la degradación de determinados péptidos tóxicos derivados de las α -gliadinas (Shan *et al.*, 2004). Todas las PEP analizadas manifestaron una resistencia moderada a las enzimas gástricas, salvo a la pepsina (la PEP de *Myxococcus xanthus* fue la que proporcionó una mayor resistencia). También manifestaron una actividad elevada al pH existente en el lumen del intestino delgado superior de rata (pH 6-7). Estas propiedades de las PEP estudiadas sugieren su utilidad en el tratamiento de la enfermedad celíaca, siempre y cuando se formulen de tal modo que resistan el tránsito por el estómago y sean liberadas en el intestino delgado.

No obstante, todos estos estudios se llevaron a cabo con péptidos sintéticos. Para avanzar en la investigación del empleo profiláctico de un preparado de estas enzimas (DPP, DCP y/o PEP) fue necesario analizar su comportamiento frente a hidrolizados fisiológicos de proteínas enteras del gluten (Marti *et al.*, 2005; Stepniak *et al.*, 2006). El tratamiento con PEP redujo drásticamente la cantidad de péptidos inmunogénicos, sobre todo en las muestras de gluten hidrolizado que también fueron tratadas con enzimas coadyuvantes, como las DPP y las DCP. Los epítomos tóxicos derivados de las α -gliadinas son más susceptibles a la destrucción con PEP que los derivados de las γ -gliadinas. En cualquier caso, se confirmó la pérdida de inmunogenicidad de estos epítomos tóxicos resistentes en la mayor parte de las líneas celulares de linfocitos T empleadas en estos estudios (Marti *et al.*, 2005; Stepniak *et al.*, 2006).

I.1.6.1.2. Detoxificación de harinas de trigo mediante procesos fermentativos con lactobacilos de elevada capacidad proteolítica

En la Universidad de Bari (Italia) se ha elaborado la primera masa panificable a base de harina de trigo (30%) cuyo contenido en péptidos inmunoestimulantes ha sido reducido durante el proceso fermentativo gracias a la actuación de las proteinasas de determinados lactobacilos (Di Cagno *et al.*, 2004). Las características organolépticas de este pan eran aceptables y fue bien tolerado por la mayoría de los pacientes celíacos utilizados en el test *in vivo*, los cuales no mostraron alteración de la permeabilidad intestinal tras su ingesta.

I.1.6.2. Bloqueo de los receptores de la zonulina

La zonulina es una proteína cuya función es la de favorecer de manera transitoria la permeabilidad de tejidos epiteliales tales como el intestinal o la barrera hematoencefálica. El hecho de que el aumento de permeabilidad del epitelio intestinal sea una de las características del desarrollo de la atrofia intestinal y que los niveles de zonulina sean mucho más elevados de lo normal en personas celiacas, implica que la zonulina está íntimamente relacionada con el desarrollo de esta enfermedad. La zonulina está implicada en varias enfermedades autoinmunes. Estudios previos indican que el bloqueo del receptor de la zonulina evita el desarrollo de la diabetes tipo I en ratas (Watts *et al.*, 2005).

Alba Therapeutics, en colaboración con el Dr. Fasano (Universidad Maryland School of Medicine, Baltimore, USA) ha desarrollado un medicamento oral antagonista del receptor de la zonulina para el tratamiento de la celiaquía: el AT-1001 (en septiembre de 2005 entró en fase clínica I).

I.1.6.3. Inhibición de la transglutaminasa tisular (TGt)

La desamidación causada por la *transglutaminasa tisular* (TGt) es esencial para el reconocimiento de los péptidos de gliadinas por los receptores HLA-DQ2/8 existentes en las células presentadoras de antígenos (APCs) y, por lo tanto, es imprescindible para inducir una respuesta de los linfocitos T CD4+ en los enfermos celiacos (Molberg *et al.*, 2001).

La TGt es una buena diana para el tratamiento terapéutico de la enfermedad celiaca. El desarrollo de fármacos que inhiban su acción es un campo prometedor. El grupo de investigación del Dr. Chaitan Khosla (Universidad de Stanford, USA) ha desarrollado varios compuestos derivados del dihidroisoxazol capaces de inhibir irreversiblemente la actividad de la TGt humana (Choi *et al.*, 2005). Dichos compuestos son solubles en agua y poseen una elevada actividad inhibitoria. Sin embargo, todavía están pendientes los análisis sobre su estabilidad, inocuidad, biodisponibilidad y efectividad, tanto en modelos animales como humanos.

I.1.6.4. Neutralización del interferón γ (INF γ)

El interferón γ (INF γ) es la citoquina dominante producida por las células T sensibles al gluten y es la principal responsable de la inflamación del epitelio intestinal en pacientes celiacos. Por tanto, la administración de anticuerpos que reaccionen contra el INF γ posiblemente frenase los efectos citotóxicos de estas proteínas. La casa comercial Protein Design Labs ha realizado un

estudio en el que el medicamento Fontolizumab (Huzaf) ha demostrado tener actividad clínica y excelente tolerancia en enfermos con enfermedad de Crohn de moderada a severa. Por otra parte, Advanced Biotherapy ha patentado anticuerpos anti INF γ y está estudiando su empleo para el tratamiento de varias enfermedades de base autoinmune.

I.1.6.5. Neutralización de la interleucina 15 (IL15)

La interleucina 15 (IL15) es el principal mediador de la respuesta inmune innata en la enfermedad celiaca: un péptido derivado de la α -gliadina (31-49) provoca, mediante una ruta que implica a la IL15, la expresión de moléculas MIC en la superficie de las células epiteliales del intestino delgado. Los linfocitos T, infiltrados a través del epitelio, reaccionan con MIC a través de sus receptores NKG2D, provocando una respuesta citotóxica. La neutralización de la IL15 podría evitar la expresión de MIC y, por lo tanto, la respuesta citotóxica contra los enterocitos. El AMG 714 se trata de un anticuerpo anti-IL15 producido por la casa comercial Amgen. Se encuentra en fase clínica II para la artritis reumatoide, con resultados muy positivos. También se prevé estudiar la acción de este anticuerpo frente a la enfermedad de Crohn.

I.1.6.6. Inhibición de la migración de los linfocitos T

La integrina $\alpha 4\beta 7$ es una molécula adhesiva que se expresa en la superficie de los linfocitos T y que les permite migrar hacia la lámina propia del intestino delgado. La casa comercial Millenium Pharmaceuticals ha creado un anticuerpo monoclonal humano, denominado MLN02 capaz de unirse a la integrina $\alpha 4\beta 7$, evitando así la migración de los linfocitos T hacia el intestino delgado. El medicamento se encuentra en fase clínica II para el tratamiento de la enfermedad de Crohn y el Síndrome de Colon Irritable (IBS).

La integrina $\alpha 4$ es otra molécula adhesiva que se expresa en la superficie de los linfocitos T y que les permite migrar hacia los tejidos inflamados. Las casas comerciales Elan/Biogen y Glaxo Smithkline han creado un par de antagonistas (el Natalizumab y el T0047, respectivamente) capaces de unirse a la integrina $\alpha 4$, evitando así la migración de los linfocitos T a través de la barrera hematoencefálica, evitando así la reacción citotóxica que causa la esclerosis múltiple. La comercialización del Natalizumab se aprobó en noviembre de 2004, pero algunas complicaciones causaron su cancelación en febrero de 2005. El T0047 se encontraba en fase clínica II en el momento de ser suspendido, debido a los problemas surgidos con el Natalizumab.

I.1.7. Tratamiento

La EC es una intolerancia al gluten de carácter permanente, cuyo único tratamiento posible consiste en eliminar el gluten de la dieta y, por lo tanto, los cereales que lo contienen (trigo, cebada y centeno) y los productos elaborados a partir de ellos. Cuando se elimina el gluten de la dieta, la persona alcanza un buen estado nutritivo en un periodo de varias semanas o meses, y desaparece la sintomatología característica de la enfermedad (Holmes, 1996). Por ello, el diagnóstico precoz de la EC, especialmente en las formas *silentes*, reviste gran interés y justifica plenamente los programas de despistaje en poblaciones de riesgo.

La dieta “sin-gluten” debe seguirse estrictamente durante toda la vida. En el caso de no guardar la dieta, una ausencia de síntomas no significa una ausencia de lesiones en la mucosa intestinal. De aquí se deduce la importancia que tiene asegurar que los productos que consumen los enfermos celíacos están totalmente libres de gluten, sin trazas. El seguimiento de este tratamiento es de vital importancia, puesto que si se continúa con la ingesta de gluten se puede desembocar en la llamada “**crisis celíaca**”, que se caracteriza por hemorragias cutáneas y/o digestivas, tetania hipocalcémica... además de poder producirse una severa deshidratación hipotónica, gran distensión abdominal con marcada hipopotasemia, malnutrición extrema e incluso cáncer intestinal (Holmes, 1996).

A pesar de que varios estudios clínicos han llegado a la conclusión de que el consumo de alimentos con contaminaciones de gluten por debajo de las **100 ppm** parece no afectar a los enfermos celíacos (Collin *et al.*, 2004; Catassi *et al.*, 2007), el **Comité del Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales** (*Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses*) sigue manteniendo dos niveles de gluten¹: **200 ppm** para los alimentos “sin-gluten” elaborados expresamente para celíacos, y **20 ppm** para los alimentos naturalmente libres de gluten (como la fruta, las hortalizas, la carne, el pescado...).

¹ Informe de la 28ª Reunión del Comité del Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales, Chiang Mai (Tailandia), 2006, ALINORM 07/30/26, pp. 76-8.

I.1.8. Toxicidad de la avena

Actualmente está en debate si la avena es o no tóxica. Numerosos estudios clínicos llevados a cabo en niños y adultos apoyan la idea de que la avena y sus prolaminas (**aveninas**) no son tóxicas para el colectivo celiaco (Janatuinen *et al.*, 1995; Srinivasan *et al.*, 1996; Hardman *et al.*, 1997; Holm *et al.*, 1998; Reunala *et al.*, 1998; Urbonas, 1999; Hoffenberg *et al.*, 2000; Janatuinen *et al.*, 2000; Janatuinen *et al.*, 2002; Storsrud *et al.*, 2003; Hogberg *et al.*, 2004; Holm *et al.*, 2006). Sin embargo, en algunos enfermos celiacos (2-4) se han observado ligeros síntomas intestinales producidos por el consumo de avena (Lundin *et al.*, 2003; Arentz-Hansen *et al.*, 2004; Peraaho *et al.*, 2004).

La avena pertenece a la tribu *Aveneae*, mientras que el trigo, la cebada y el centeno pertenecen a la tribu *Triticeae* (**Figura I.4**). Además, las aveninas tiene poca homología en la secuencia de aminoácidos con las prolaminas de trigo, cebada y centeno, y el contenido de prolina y glutamina es menor.

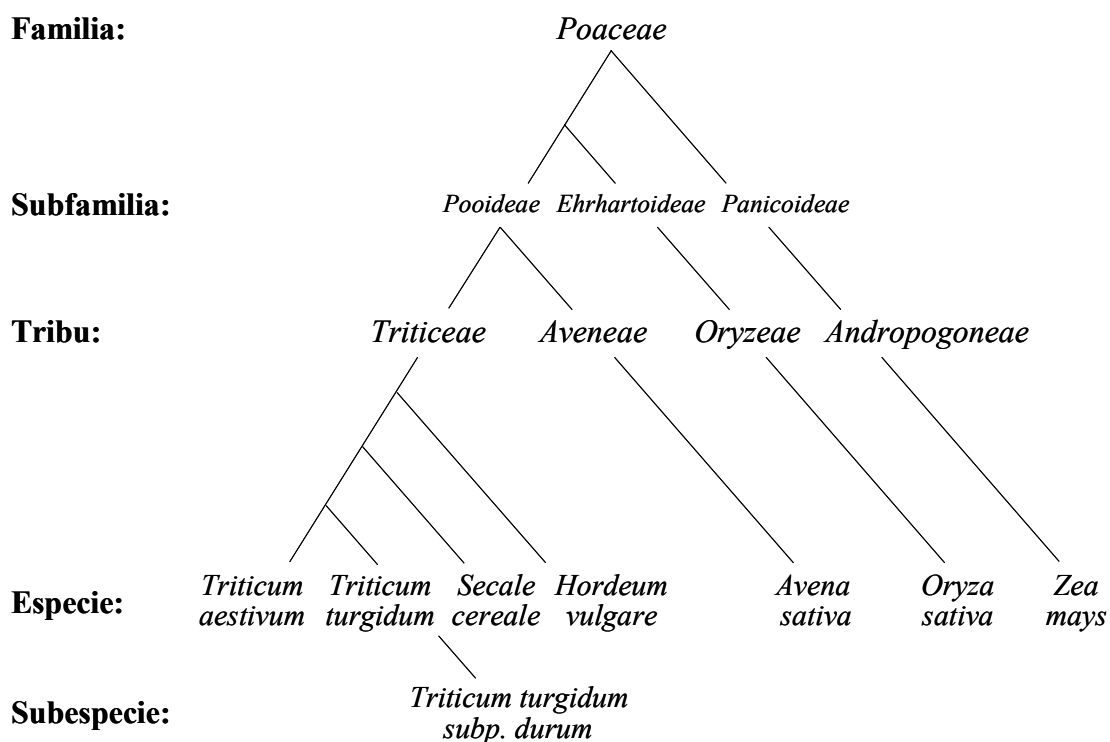


Figura I.4 Árbol filogenético de la familia *Poaceae*.

La avena aporta importantes beneficios a la dieta “sin-gluten”: aumenta el aporte de fibras favoreciendo el tránsito intestinal, presenta mayor nivel de aminoácidos esenciales como lisina y triptofano, y mejora el sabor y la textura de los alimentos que la contienen. Todos ellos son aspectos importantes que mejoran la aceptabilidad de la dieta “sin-gluten”.

Sin embargo, y hasta que se clarifique su toxicidad, el **Comité del Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales** (*Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses*) sigue considerando a la avena como uno de los cuatro cereales tóxicos para los enfermos celíacos².

I.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN/CUANTIFICACIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS

La detección de proteínas puede realizarse en muestras de alimentos frescos o procesados, siempre y cuando el procesamiento no haya afectado a las proteínas de la muestra. Por este motivo, las técnicas moleculares que suponen el manejo de proteínas son aplicadas en aquellos casos en los cuales se dispone de muestras con un contenido proteico en cantidad suficiente y con la calidad adecuada.

I.2.1. Métodos de extracción de prolaminas

I.2.1.1. Etanol 60%

El método tradicional de extracción de prolaminas en alimentos se realiza con etanol 60%. Sin embargo, en los alimentos procesados por calor (que se corresponden con el 80-90% de los alimentos que usualmente consumen los enfermos celíacos), el etanol 60% sólo extrae entre el 31 y el 63% de las prolaminas (García *et al.*, 2005). Por lo tanto, las prolaminas de los alimentos procesados por calor no se pueden medir con exactitud si se utiliza etanol 60% (independientemente del tipo de ELISA que se utilice).

² Informe de la 28ª Reunión del Comité del Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales, Chiang Mai (Tailandia), 2006, ALINORM 07/30/26, pp. 76-8.

I.2.1.2. “Cocktail de Extracción”

El “*Cocktail de Extracción*” (Garcia *et al.*, 2005) está basado en agentes reductores y desnaturalizantes (como el clorhidrato de guanidina y el β -mercaptoetanol) que solubilizan los agregados insolubles de todas las fracciones de las prolaminas (α , β , γ y ω), abren la conformación de estas proteínas y favorecen su solubilidad en etanol 60%, permitiendo así que puedan ser extraídas en su totalidad y posteriormente analizadas con el ELISA-R5 Sándwich, el *Western Blot* R5 y/o las Tiras Inmuncromatográficas R5 (el “*Cocktail de Extracción*” no es compatible ni con la EM MALDI-TOF ni con el ELISA-R5 tipo “Competitivo”).

La extracción de prolaminas con el “*Cocktail de Extracción*” es *cuantitativa*, con una recuperación próxima al **100%** (Garcia *et al.*, 2005). Dependiendo del tipo de alimento, el “*Cocktail de Extracción*” da valores ligeramente similares o más altos que el etanol 60%: 1,1 veces en el caso de alimentos no tratados con calor, 1,4 veces en almidones de trigo y 3,0 veces en alimentos tratados con calor (Garcia *et al.*, 2005).

El “*Cocktail de Extracción*” viene incluido en todos los kits de ELISA-R5 Sándwich (**apartado I.2.2.1.2**) y en la actualidad es el único método que existe para la extracción de prolaminas en alimentos tratados con calor (aunque también se puede utilizar en alimentos sin calentar).

I.2.2. Métodos inmunológicos

I.2.2.1. Métodos de ELISA

I.2.2.1.1. ELISA- ω Sándwich

Los análisis de **ELISA** (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* o inmunoensayo ligado a enzima) detectan o miden la concentración de la proteína de interés en una muestra que puede contener numerosas proteínas distintas. En el ELISA “Sándwich” se utiliza un *anticuerpo* fijado a un soporte, que se une específicamente a la proteína diana (que funciona como *antígeno*). Un segundo anticuerpo conjugado a un enzima genera un producto cuyo color es visible al añadir un sustrato determinado, y es fácilmente cuantificable mediante una curva patrón de la proteína de interés.

El método de ELISA- ω Sándwich, basado en el anticuerpo contra las ω -gliadinas, fue aprobado por la AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) en 1991 (Skerritt & Hill, 1991). Este sistema sólo detecta las prolaminas de trigo y de centeno (no detecta las de cebada), la fracción omega representa un porcentaje muy pequeño del total de las prolaminas (entre un 5% y un 20%, dependiendo de la variedad) y tiene una sensibilidad entre 200-400 ppm de gluten, insuficiente para detectar los dos niveles de gluten establecidos por el **Comité del Codex** para los alimentos “sin-gluten” (20-200 ppm).

Posteriormente, a partir del anticuerpo contra las ω -gliadinas se han desarrollado varios kits comerciales de ELISA con una mayor sensibilidad (~20 ppm). Estos ELISAS fueron aceptados por la AOECs (*Association Of European Coeliac Societies*) y por los países nórdicos (Finlandia y Suecia, entre otros) como métodos oficiales de análisis de gluten en alimentos para celíacos. Sin embargo, ninguno de estos kits fue aprobado por el *Codex Alimentarius* como método para analizar gluten en alimentos para celíacos.

I.2.2.1.2. ELISA-R5 Sándwich

El ELISA-R5 Sándwich (Valdes *et al.*, 2003; Mendez *et al.*, 2005) está basado en el anticuerpo monoclonal R5 (AcM R5), producido a partir de un ratón inmunizado con extractos etanólicos de centeno (Sorell *et al.*, 1998). Este sistema es capaz de detectar las prolaminas del trigo (*gliadinas*), la cebada (*hordeinas*) y el centeno (*secalinas*) por igual y con una sensibilidad de **1,5 ppm**. Además, el AcM R5 tiene la capacidad de detectar todas las fracciones proteicas de las prolaminas (α , β , γ y ω) de todas las variedades de los cereales tóxicos para los enfermos celíacos. La buena reproducibilidad y repetitibilidad del método (8,7% y 7,7%, respectivamente) ha supuesto un avance muy importante en el análisis de gluten en alimentos.

El AcM R5 reconoce el pentapéptido potencialmente tóxico *QQPFP*, que aparece muy repetido en las gliadinas, hordeínas y secalinas (Osman *et al.*, 2001), lo que permite que en el ELISA-R5 Sándwich se pueda utilizar el mismo anticuerpo (R5) para el recubrimiento y para el conjugado con peroxidasa.

El AcM R5 también reconoce otros péptidos de las gliadinas, pero con una menor intensidad: *QQQFP*, *LQPFP*, *QLPFP*, *QRPFA*, *QQSFP*... (Kahlenberg *et al.*, 2003; Kahlenberg *et al.*, 2006). Algunos de estos epítomos están contenidos en la región potencialmente tóxica de **33 aminoácidos** de las α -gliadinas (Shan *et al.*, 2002). La capacidad del AcM R5 de detectar estos dos péptidos (el *QQPFP* y el *33-mer*) hace que el ELISA-R5 Sándwich pueda detectar

secuencias potencialmente tóxicas y, por lo tanto, representa una importante llave para el control del gluten en los alimentos para celíacos.

El AcM R5 ha sido la base para el desarrollo de cuatro *kits* comerciales de ELISA tipo “Sándwich”: *RIDASCREEN® Gliadin* y *RIDASCREEN® FAST Gliadin* (*r-Biopharm*), *Ingezim Gluten* (*Ingenasa*) y *Transia Plate Prolamins* (*Diffchamb*).

En 2006 el **ELISA-R5 Sándwich** fue aceptado por el **Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras** (*Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling*) como método “Tipo I” para el análisis de gluten en alimentos para celíacos³.

1.2.2.1.3. ELISA-R5 Competitivo

Un elevado número de alimentos “sin-gluten” están sometidos a procesos de hidrólisis durante su elaboración. El gluten de estos productos (*maltas, cervezas, siropes, alimentos infantiles...*) se encuentra parcial o totalmente hidrolizado. Como consecuencia, algunos de estos fragmentos hidrolizados podrían contener un solo epítipo QQPFP y, por lo tanto, no ser detectados con el ELISA-R5 tipo “Sándwich”, dando lugar a subestimaciones de los niveles de prolaminas.

Para resolver el problema de la cuantificación de gluten en alimentos hidrolizados hemos desarrollado un **ELISA-R5 “Competitivo”** basado en el AcM R5 (Ferre *et al.*, 2003). Este ELISA presenta una buena reproducibilidad (7,7%), repetitibilidad (4,7%) y recuperación (90-98%).

1.2.2.2. Western Blot R5

El *Western Blot* es un método *semicuantitativo* basado en una primera separación de las proteínas (según su peso molecular) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, seguida de una transferencia de las proteínas a membranas de PVDF, una incubación con el AcM R5 conjugado con peroxidasa y una posterior detección por quimioluminiscencia utilizando *Immobilon™ Western* (Millipore). La alta sensibilidad de la técnica permite detectar prolaminas a niveles de *1,5 ppm* y confirmar los resultados obtenidos con los ELISAs y/o la Espectrometría de Masas MALDI-TOF.

³ Informe de la 27ª Reunión del Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras, Budapest (Hungría), 2006, ALINORM 06/29/23, pp. 8.

La técnica de *Western Blot*, al estar basada en la separación de las prolaminas en función de su peso molecular, permite discriminar el origen de la contaminación: si es de trigo, de cebada o de centeno. Sin embargo, en alimentos contaminados con mezclas de estos tres cereales, la identificación se hace mucho más difícil. Por otro lado, el *Western Blot* también permite determinar si las prolaminas se encuentran nativas o hidrolizadas.

I.2.2.3. Tiras inmunocromatográficas R5

Este nuevo sistema de análisis de gluten, desarrollado y comercializado por la empresa española *Operón*, se basa en la inmovilización del AcM R5 sobre tiras de nitrocelulosa. Permite *detectar* y *semicuantificar*, de forma rápida y sencilla, contaminaciones de prolaminas en alimentos “sin-gluten”, con una sensibilidad de 2 a 5 ppm (García *et al.*, 2001). Entre las ventajas de las tiras en comparación con los ELISAs están su *rapidez* (resultados en sólo 5-10 minutos), su menor *coste*, no necesitan grandes aparatos y la interpretación es enormemente sencilla. Además, son compatibles con el sistema de extracción de prolaminas “*Cocktail de Extracción*” ([apartado I.2.1](#)). Todas estas características hacen de las tiras inmunocromatográficas una herramienta muy útil para países en vías de desarrollo que no se pueden costear los caros métodos de ELISA.

I.2.3. Métodos no inmunológicos

I.2.3.1. Espectrometría de Masas MALDI-TOF

La tecnología de Espectrometría de Masas MALDI-TOF (EM MALDI-TOF) se ha convertido en los últimos años en una poderosa herramienta en las Ciencias de la Vida para el análisis rápido y directo de extractos biológicos complejos, incluyendo los extractos de proteínas de cereales. En el caso de la analítica del gluten, la EM MALDI-TOF se utiliza como herramienta no inmunológica para la detección de gluten en alimentos dietéticos para celíacos (Camafeita *et al.*, 1997b; Mendez *et al.*, 2000; Hernando *et al.*, 2003). Este método está basado en la observación directa de los perfiles de las prolaminas. Los *espectros de masas* de las prolaminas del trigo (*gliadinas*), la cebada (*hordeínas*) y el centeno (*secalinas*) presentan perfiles distintos: las *gliadinas* tienen masas moleculares entre 30 y 55 kDa, con picos característicos entre 30-35 kDa; las *hordeínas* tienen masas moleculares entre 30 y 45 kDa; y las *secalinas* tienen dos picos característicos en 32 y 39 kDa.

Al igual que el *Western Blot R5* ([apartado 1.2.2.2](#)), la EM MALDI-TOF permite determinar si las proteínas del gluten se encuentran nativas, hidrolizadas y/o tratadas con calor. Las fracciones α y β/γ de las prolaminas se desnaturalizan con el calor y forman agregados insolubles que no pueden ser extraídos en su totalidad con el método convencional de etanol 60%, mientras que la fracción ω es termoestable y se extrae cuantitativamente con etanol 60% (Wieser, 1998). Por lo tanto, en los alimentos tratados con calor la señal de las ω -prolaminas se ve aumentada respecto de las α - y β/γ -prolaminas, llegando incluso a desaparecer en aquellos alimentos sometidos a un elevado tratamiento térmico.

La EM MALDI-TOF permite confirmar los resultados de los ELISAs y descartar falsos positivos. Con esta técnica se pueden analizar multitud de alimentos en tan solo unos minutos y detectar prolaminas con una sensibilidad de *40-50 ppm*. Sin embargo, una de las limitaciones de la técnica es su elevado precio, lo que limita que pueda estar disponible en muchos laboratorios.

I.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN/CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN ALIMENTOS

La emergencia de la **biología molecular** ha dado lugar a nuevas herramientas moleculares que se han adaptado rápidamente al campo del control de calidad de productos alimenticios. Este nuevo enfoque utiliza factores *genotípicos* más que *fenotípicos* para identificar determinadas contaminaciones. Así, por ejemplo, la detección del ADN de los cereales que contienen gluten (trigo, cebada o centeno) en una muestra de un alimento presupone la existencia de dichas proteínas, y viceversa.

Los métodos de identificación de proteínas están siendo reemplazados por técnicas basadas en el análisis de ADN, principalmente debido a la degradación que sufren las proteínas y a que muchas de ellas son *termolábiles*. Los análisis basados en el ADN parecen ser los más adecuados para la **identificación de especies** (autenticación), como así lo muestran tanto los trabajos publicados como las recientes patentes.

I.3.1. Extracción y purificación de ADN

Para llevar a cabo la detección de secuencias específicas de ADN es fundamental disponer de métodos de extracción y purificación de ácidos nucleicos que permitan obtener fracciones de ADN de pureza y calidad óptimas (Hotzel *et al.*, 1999). La calidad de un extracto de ADN viene determinada principalmente por la ausencia de contaminantes y por la longitud media de las

moléculas de ADN obtenidas (Meyer *et al.*, 1996). El rendimiento también juega un papel importante en la elección del método de extracción de ADN, ya que es esencial que el extracto contenga suficientes moléculas de ADN amplificables. El rendimiento de la extracción va a depender de una serie de factores como el tamaño de partícula, la homogeneidad de la muestra y la cantidad de muestra de partida (Holden *et al.*, 2003). Otros aspectos que hay que considerar en la elección de un método de extracción de ADN son el tiempo necesario para realizar la extracción, el coste de cada extracción, la utilización de disolventes contaminantes y la cantidad de muestra mínima que se necesita para realizar la extracción.

Los métodos de extracción de ADN a partir de alimentos se pueden clasificar en dos grupos principales: los que dan un rendimiento de extracción bajo y una calidad buena (*Wizard*[®], *DNeasy*, *Nucleon Phytopure*, *CTAB*...) y los que dan un rendimiento de extracción elevado a expensas de la reducción de la calidad del extracto (*ROSE*, *NaOH*, *Chelex*[®] 100, *PrepMan*[™] *Ultra*...). En esta Tesis Doctoral se han probado tres métodos distintos de extracción de ADN: uno comercial [*PrepMan*[™] *Ultra* (Applied Biosystems, Foster City, USA)] y dos basados en protocolos publicados en la bibliografía [*Método Wizard*[®] (Zimmermann *et al.*, 1998b) y *método del CTAB* (Murray & Thompson, 1980)].

I.3.1.1. **PrepMan[™] Ultra**

Este reactivo comercial de extracción de ADN tiene una serie de ventajas frente a otros protocolos publicados en la bibliografía:

- Es un método rápido, sencillo y económico, con unos mínimos requerimientos de equipamiento (sólo se necesita una microcentrífuga) y con un bajo coste por extracción.
- La fórmula exclusiva del *PrepMan*[™] *Ultra*, desarrollada por Applied Biosystems, inactiva los inhibidores de la PCR, dando lugar a unos resultados muy reproducibles. Además, no contiene *Chelex*[®] ni ningún otro tipo de resina.
- Al principio fue desarrollado para la extracción de ADN de bacterias *Gram-negativas*, presentes en distintos tipos de alimentos. Este tipo de muestras suelen tener un alto contenido en lípidos, que pueden llegar a inhibir la posterior reacción de PCR. En la actualidad, el *PrepMan*[™] *Ultra* se aplica en una gran variedad de muestras diferentes: se usa para extraer el ADN de bacterias, levaduras, hongos filamentosos...

I.3.1.2. Método *Wizard*[®]

Este procedimiento de extracción de ADN comienza suspendiendo la muestra en un tampón de extracción. Los distintos componentes de este tampón de extracción permiten obtener un ADN de alta calidad. El TRIS actúa como regulador del pH, manteniéndolo en 8,0. El EDTA actúa acomplejando cationes divalentes, como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} (Wilson, 1997), de modo que la presencia de EDTA en el tampón TNE protege al ADN de la acción de las *nucleasas* (enzimas que degradan el ADN y que utilizan estos iones como cofactores). El NaCl aporta fuerza iónica al medio. El SDS (detergente aniónico), la proteínasa K (enzima que degrada proteínas) y el clorhidrato de guanidina (agente caotrópico) son capaces de lisar las células y solubilizar las proteínas, liberando al medio los ácidos nucleicos. El último paso consiste en purificar los extractos de ADN con columnas *Wizard*[®] *Plus Minipreps* (Promega, Madison, USA), que utilizan resinas que presentan afinidad por los ácidos nucleicos.

I.3.1.3. Método del CTAB

El método del CTAB (Murray & Thompson, 1980), que inicialmente se desarrolló para la purificación de ADN de muestras vegetales, es actualmente uno de los métodos más utilizados para el análisis de alimentos. El fundamento es similar al del método *Wizard*[®], pero en este caso no se utiliza proteínasa K. La extracción de los ácidos nucleicos se realiza con un tampón de extracción (Tris-HCl, sorbitol, EDTA), un tampón de lisis (Tris-HCl, NaCl, EDTA, CTAB) y un detergente (N-Lauroylsarcosina). El CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) es una sal de amonio cuaternario que produce una precipitación selectiva de los polisacáridos, conocidos inhibidores de la actividad de la ADN polimerasa durante la reacción de amplificación (Wilson, 1997). La siguiente fase consiste en purificar los extractos de ADN con cloroformo:alcohol isoamílico, mediante la cual se eliminan los compuestos hidrofóbicos y las proteínas restantes. Por último, el ADN que permanece en la fase acuosa, se separa de los restantes componentes mediante precipitación con isopropanol y se lava con etanol 70% frío.

I.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica que permite obtener *in vitro* múltiples copias de una secuencia de ADN específica (secuencia diana) incluso cuando ésta se encuentra en una muestra compleja junto con otras moléculas de ADN. Esta técnica, que se comenzó a utilizar al final de la década de los 80 (Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988), supuso una revolución en el campo de la biología molecular.

La PCR se basa en una polimerasa de ADN termoestable que, como todas las polimerasas de ADN, sintetiza una hebra de ADN en dirección 5'→3' incorporando los desoxinucleótidos correspondientes a partir de un *primer* (cebador) y otra cadena de ADN sencilla que actúa de molde. El proceso de amplificación consiste en repetir varias veces un ciclo con tres periodos de incubación en los cuales se produce sucesivamente la desnaturalización del ADN bicatenario (fase de desnaturalización), la hibridación de cada molécula de ADN monocatenario con su respectivo *primer* (fase de hibridación) y finalmente la síntesis de la nueva molécula de ADN (fase de elongación). Este proceso se lleva a cabo de forma automática en un aparato denominado termociclador, del cual existen muchos modelos comercializados.

Como se muestra en la **Figura I.5**, durante la fase de desnaturalización se somete a la mezcla de reacción a una temperatura de unos 95°C para que se rompan los puentes de hidrógeno que unen las dos cadenas de ADN y se separen. Una vez que el ADN se encuentra desnaturalizado, es necesario bajar la temperatura hasta 50-72°C para que los *primers* puedan hibridar con sus secuencias complementarias en las hebras sencillas de ADN. A partir de este momento, se eleva la temperatura de la reacción hasta 72°C, que es el óptimo de la polimerasa termoestable, para que inicie la polimerización de la hebra de ADN complementaria incorporando el desoxinucleótido complementario al que lee en la cadena de ADN molde. Las moléculas sintetizadas *de novo* también sirven como ADN molde en el siguiente ciclo de desnaturalización – hibridación – elongación, de forma que después de varios ciclos sucesivos se obtiene la amplificación exponencial de la secuencia diana (**Figura I.6**).

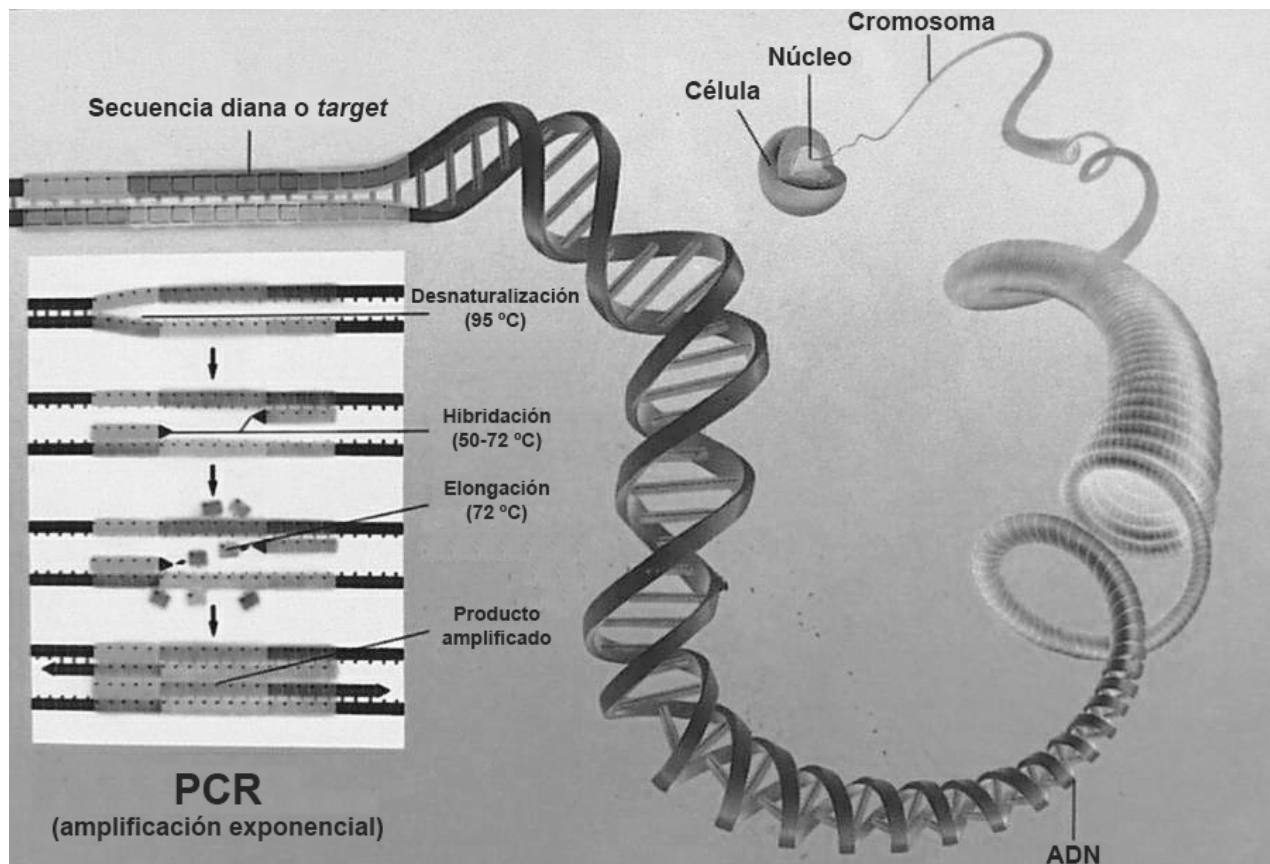


Figura I.5 Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa.

En esta amplificación exponencial, diferencias mínimas en cualquiera de las variables que afectan a la eficiencia de la amplificación pueden alterar drásticamente el rendimiento de la reacción después de varios ciclos (Gilliland *et al.*, 1990; Zimmermann & Mannhalter, 1996; Freeman *et al.*, 1999). En estas circunstancias la cuantificación basada simplemente en el rendimiento final de la amplificación no es viable, porque la eficiencia de amplificación varía de una reacción a otra y dentro de una misma reacción, de un ciclo a otro.

La variabilidad entre reacciones se debe a diferencias en la calidad de las muestras de ADN amplificadas, errores de pipeteo... La presencia de inhibidores en algunas muestras de ADN puede limitar la reacción de amplificación y provocar una infraestimación de la cantidad de secuencias diana o incluso originar falsos negativos.

Durante el transcurso de la amplificación, se suceden varias etapas con distinta cinética de reacción. La primera fase obedece a un aumento exponencial de la cantidad de producto. La duración de esta fase depende del número inicial de moléculas diana y sólo se puede determinar empíricamente en cada sistema (Freeman *et al.*, 1999). Después de varios ciclos de

amplificación, la enzima va perdiendo actividad, los reactivos se van agotando y se acumula tanto producto que las hebras complementarias del amplicón hibridan entre sí, en lugar de hacerlo con los *primers*. Por lo tanto, esta situación de pérdida de eficiencia progresiva limita el crecimiento exponencial de producto y finalmente, la reacción entra en fase de “plateau”, en la cual la eficiencia de amplificación es prácticamente nula.

El análisis por PCR puede ser de dos naturalezas: **cuantitativo** (detección de la presencia o ausencia de un fragmento de ADN determinado) o **cuantitativo** (detección de la cantidad de un fragmento de ADN determinado).

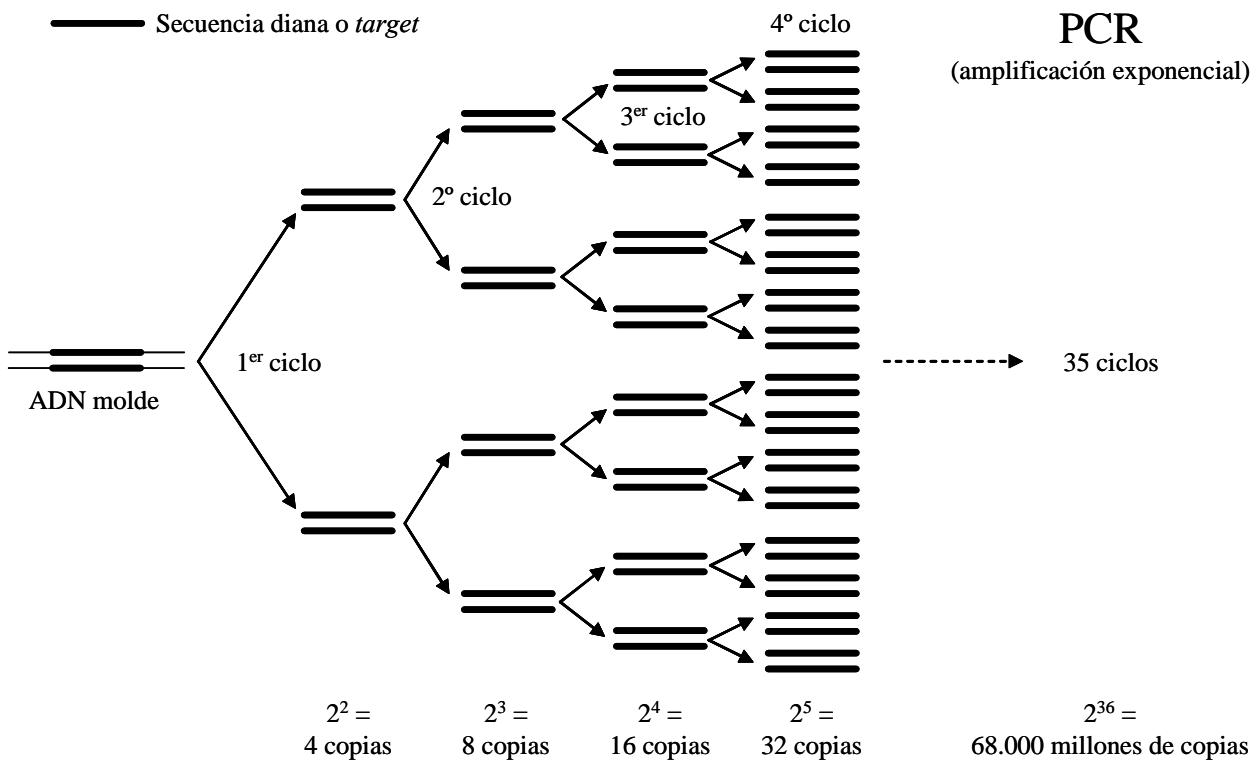


Figura I.6 Representación gráfica de una reacción de amplificación de una secuencia diana o *target* (35 ciclos).

I.3.3. Análisis cualitativo del ADN mediante PCR

La técnica de PCR es muy específica, pero existe la posibilidad de que se obtengan amplificaciones inespecíficas de tamaños similares al investigado. Para garantizar que el fragmento de ADN amplificado contiene la secuencia diana elegida, se han desarrollado varios ensayos de confirmación que siguen distintas estrategias:

I.3.3.1. PCR y geles de agarosa

Consiste en el empleo de dos *primers* de secuencia específica para la amplificación mediante PCR del ADN de interés. Tras realizar la PCR, se someterán los productos de amplificación a electroforesis en geles de agarosa. Si aparece una banda de ADN del tamaño esperado, se confirma la presencia del organismo. Esta técnica es útil para examinar el ADN procedente de tejidos que se sospechan infectados, incluso en ausencia de patógeno observable en el cultivo. Se usa en la identificación de infecciones virales e intracelulares.

Inicialmente se empleó el *bromuro de etidio* como marcador de ácidos nucleicos. Sin embargo, en la actualidad se está imponiendo la tinción con *SYBR[®] Green I*, marcador de ADN menos tóxico y más sensible que el *bromuro de etidio*.

- ***Bromuro de etidio***

El *bromuro de etidio* es un agente intercalante usado comúnmente como marcador de ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular para procesos como la electroforesis en geles de agarosa. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz roja-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN. Como la mayoría de los compuestos fluorescentes, es una sustancia aromática. Como el *bromuro de etidio* se intercala en el ADN, esta sustancia tiene un poderoso efecto mutágeno y, posiblemente, puede ser cancerígeno o teratógeno.

- ***SYBR[®] Green I***

La tinción con *SYBR[®] Green I* fue introducida a mediados de la década de los noventa por la casa comercial *Molecular Probes*, con el fin de ofrecer un producto menos tóxico que el bromuro de etidio y con una mayor sensibilidad para la visualización de ADN en geles de agarosa y/o poliacrilamida (Schneeberger *et al.*, 1995). La sensibilidad excepcional del marcador *SYBR[®] Green I* lo hace útil para aquellos usos donde la cantidad de ADN es restrictiva, incluyendo la detección de pocas copias de productos de amplificación. El *SYBR[®] Green I* puede emplearse: (a) tiñendo las muestras antes de la electroforesis (Rye *et al.*, 1992; Rye *et al.*, 1993); (b) tiñendo el gel antes de que polimerice; o (c) tiñendo el gel tras la electroforesis. Según las instrucciones del fabricante (*Roche Diagnostics*), la mayor sensibilidad del *SYBR[®] Green I* se obtiene en el caso (b): añadiéndolo directamente al gel de agarosa, antes de que se enfríe.

I.3.3.2. Southern Blot

Los fragmentos de ADN producidos durante la reacción de amplificación son separados en un gel de agarosa o acrilamida, y se transfieren por capilaridad a un filtro de nitrocelulosa o nylon, donde quedan retenidos por adsorción. Posteriormente se fijan covalentemente mediante radiación ultravioleta o calor, de modo que el filtro es una réplica exacta del gel. Finalmente se hace hibridar con una sonda de ácidos nucleicos: una sola hebra de ADN que contiene una secuencia característica del organismo en cuestión. La sonda puede tener una longitud de hasta varias kb (kilobases), si bien son muy específicos los oligonucleótidos sintéticos de unas 20 pb o menos. Cuando la muestra de un determinado alimento contiene secuencias de ADN complementarias a la de la sonda, pueden hibridarse las dos secuencias (siguiendo una preparación adecuada de la muestra para dar lugar a un ADN monocatenario), formándose una molécula de dos cadenas. Para detectar que ha ocurrido una reacción, se marca la sonda con una molécula indicadora (“reporter”) un isótopo radiactivo, una enzima o un compuesto fluorescente que puede medirse en cantidades muy pequeñas tras la hibridación (Hupfer *et al.*, 1997; Hupfer *et al.*, 1998; Studer *et al.*, 1997; Vollenhofer *et al.*, 1999).

I.3.3.3. PCR anidada (Nested-PCR)

Se basa en reamplificar los productos de PCR utilizando unos *primers* que hibriden en una región interna del amplicón. Los productos que se obtienen de esta segunda amplificación se separan mediante electroforesis convencional en placa y se comprueba que el fragmento obtenido tiene el tamaño esperado (Hassan-Hauser *et al.*, 1998; Koppel *et al.*, 1998; Zimmermann *et al.*, 1998a; van Duijn *et al.*, 1999). La técnica de PCR anidada concede al sistema una extremada sensibilidad (Hoef *et al.*, 1998; Stram *et al.*, 2000). Se trata de una técnica que hay que utilizar con cuidado, ya que, si bien permite identificar falsos positivos debidos a la inespecificidad de la primera amplificación, el incremento de las etapas de manipulación de la muestra supone un riesgo adicional de falsos positivos debidos a contaminaciones en el laboratorio por productos de PCR anteriores.

I.3.3.4. Análisis de restricción

Las enzimas de restricción son endonucleasas que actúan sobre secuencias concretas de ADN, denominadas dianas de restricción. El análisis de restricción consiste en la comparación de los tamaños teóricos, deducidos a partir de la secuencia conocida de ADN amplificada, con los tamaños de los fragmentos que se obtienen experimentalmente después de la digestión de los

productos de PCR con determinadas enzimas de restricción y separación mediante electroforesis convencional en gel (Brodmann *et al.*, 1997; Hassan-Hauser *et al.*, 1998; Lipp *et al.*, 1999; Lipp *et al.*, 2001). Este método es bastante sencillo, pero también es difícil de automatizar.

I.3.3.5. Secuenciación del ADN

Además de las técnicas mencionadas anteriormente, una de las aplicaciones de la PCR consiste en la secuenciación del ADN de muestras biológicas. Esta técnica consta de cuatro etapas, siendo la primera de ellas el aislamiento del material genético presente en la muestra, seguida de una amplificación por PCR de los fragmentos de ADN que se quieran identificar. Esta amplificación se realiza mediante la utilización de marcadores fluorescentes de distinto color, que permiten la identificación de la secuencia nucleotídica.

Esta estrategia ha sido utilizada por centros de investigación españoles como el *IIM (Instituto de Investigaciones Marinas, Vigo, CSIC: <http://www.iim.csic.es>)*, con el fin de realizar la identificación de numerosas especies pesqueras de interés comercial en el territorio español. La secuenciación del ADN de la muestra se aplica frecuentemente como método de confirmación posterior a las anteriores técnicas cualitativas por PCR.

La secuenciación parcial o completa del amplicón obtenido por PCR es el método más fidedigno para confirmar la secuencia amplificada. Sin embargo, resulta caro y pocos laboratorios se pueden permitir aplicarlo como método de análisis rutinario (Hupfer *et al.*, 1997).

I.3.4. Análisis cuantitativo del ADN mediante PCR

En la actualidad, el desarrollo de métodos cuantitativos de PCR es una necesidad que está justificada por varias razones. Por un lado, la entrada en vigor de la normativa en relación al etiquetado y a la trazabilidad de los alimentos transgénicos que establece valores umbrales de contenido de GMO en alimentos (0,5% ó 0,9%, en función de si están o no aprobados). Por otro lado, aunque los métodos de detección basados en la PCR presentan sensibilidad suficiente para detectar trazas de determinadas secuencias de ADN en un alimento, diferentes estudios entre laboratorios ponen de manifiesto su falta de reproducibilidad en los resultados (Hubner *et al.*, 1999). Las principales limitaciones de estos métodos residen en su carácter cualitativo y en la existencia de falsos negativos. El carácter cualitativo de los métodos basados en PCR convencional se debe a que la cantidad de producto generada no siempre guarda una relación

directa con la cantidad de secuencia diana presente en la muestra al comienzo de la reacción de amplificación (Raeymakers, 1993; Freeman *et al.*, 1999). Por otro lado, algunos falsos negativos podrían ser debidos al empleo de sistemas poco sensibles para el análisis de los productos de PCR (electroforesis convencional en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio), la elección de un método de extracción de ADN inadecuado para una matriz alimentaria determinada y/o por la utilización de un sistema de amplificación poco sensible o inespecífico.

Para solventar dichas deficiencias, se están poniendo a punto nuevos procedimientos analíticos más sensibles y específicos, y se están desarrollando métodos de PCR cuantitativa con la finalidad de obtener resultados con una exactitud y reproducibilidad adecuadas.

Las técnicas de PCR cuantitativa se dividen en PCR competitiva (QC-PCR) y PCR en tiempo real (Q-PCR). Estas técnicas permiten la estimación de la concentración de una determinada secuencia de ADN en una muestra mediante comparación con curvas de ADN estándar, pero se distinguen sustancialmente en el procedimiento que emplean para generar esas curvas estándar.

I.3.4.1. PCR competitiva (QC-PCR)

La técnica de PCR competitiva o QC-PCR es un procedimiento de análisis de carácter cuantitativo que comenzó a utilizarse a principios de los años 90 (Becker-Andre & Hahlbrock, 1989; Gilliland *et al.*, 1990).

La capacidad cuantitativa de la PCR competitiva ha sido aplicada durante los últimos años principalmente a estudios de expresión génica. En situaciones en las que se dispone de poca muestra o el nivel de expresión de un determinado gen es bajo, ha demostrado ser una buena alternativa a otras técnicas de análisis de ARN, como por ejemplo el *Northern Blot* (Siebert & Larrick, 1992; Dostal *et al.*, 1994; Grassi *et al.*, 1994; Altenbach, 1998). También sirve como base para el desarrollo de métodos de diagnóstico de agentes infecciosos (Piatak *et al.*, 1993b; Brichacek & Stevenson, 1997), para la cuantificación de microorganismos en muestras tomadas de distintos ambientes (Moller & Jansson, 1997; Felske *et al.*, 1998; Johnsen *et al.*, 1999), o para la determinación del número de copias de un gen o de determinadas secuencias repetidas en el genoma de algunos organismos (Deng *et al.*, 1993; Baurens *et al.*, 1996). En alimentos, en los últimos años, se ha empleado para la detección de contaminaciones de trigo, cebada y/o centeno en alimentos “sin-gluten” (Dahinden *et al.*, 2001), para la detección y cuantificación de microorganismos patógenos (Arnal *et al.*, 1999) y para la cuantificación de GMOs en alimentos (Studer *et al.*, 1998; Hardegger *et al.*, 1999; Hubner *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 2000).

La técnica de PCR competitiva cuantitativa se basa en la introducción en la mezcla de reacción de moléculas de ADN que se amplifican con el mismo par de *primers* que la secuencia diana. Partiendo de la condición de que ambas secuencias (diana específica y competidor) se amplifican con la misma eficiencia, la relación entre los productos de PCR obtenidos es proporcional a la relación del número de secuencias específicas y competidoras al inicio de la reacción. Por lo tanto, analizando los productos de amplificación y comparando las señales correspondientes a la diana y al competidor, es posible obtener información cuantitativa sobre la secuencia diana (Piatak *et al.*, 1993a).

Las principales desventajas de la QC-PCR frente a los otros métodos de PCR cuantitativa son:

- (a) El uso de la doble escala logarítmica para la cuantificación reduce la fiabilidad cuantitativa del ensayo porque es probable que pequeñas variaciones puedan pasar desapercibidas (Freeman *et al.*, 1999).
- (b) El desarrollo de los análisis supone un tiempo considerable comparado con la PCR en tiempo-real (UE Tender Report No. XXIV/98/A3/001) y está poco automatizada.
- (c) Cuenta con una baja capacidad de procesamiento de un gran número de muestras.
- (d) A pesar de que diversos estudios colaborativos entre laboratorios europeos ponen en evidencia que el sistema de PCR competitiva da lugar a resultados más reproducibles que los sistemas basados en PCR estándar, se sigue observando cierta variabilidad que se atribuye a la insuficiente homogeneización de las muestras y a las diferencias en la determinación de la concentración de ADN (Hubner *et al.*, 1999).

I.3.4.2. PCR cuantitativa en tiempo-real (Q-PCR)

En la actualidad, los métodos que tienen más expectativas por ser los más *eficaces, rápidos* y *automatizados* sistemas de cuantificación de material genético se basan en la tecnología de la **PCR cuantitativa en tiempo-real** o **Q-PCR** (Ferre, 1992; Cross, 1995). La Q-PCR consiste en la monitorización o medición continua del incremento de los productos amplificados durante la reacción de PCR. Cuenta con sistemas de detección sensibles que permiten detectar la acumulación de productos en la fase exponencial de la reacción, cuando la eficiencia es todavía constante y existe una buena correlación entre concentración de producto amplificado y concentración inicial de moléculas diana.

La producción de productos de PCR (secuencias de ADN amplificadas) aumenta de manera exponencial, hasta alcanzar una meseta entre los ciclos de amplificación 30 y 40, debido fundamentalmente a que algunos de los componentes de la reacción son limitantes. En el caso de la Q-PCR, la concentración de ADN se mide en cada ciclo de amplificación, obteniendo así una relación de proporcionalidad entre la concentración de ADN y el número de ciclos de amplificación. La PCR convencional sólo presenta esta proporcionalidad en un rango limitado de concentraciones: al medirse los productos de la PCR al final de la reacción (ya en la meseta) se pierde la precisión en la cuantificación.

El seguimiento de la síntesis de ADN durante el transcurso de la amplificación permite trazar una curva en función de la fluorescencia emitida (R_n). Se representa ΔR_n (valor de R_n en un ciclo dado después de sustraerle la medida de la fluorescencia basal) en función del número de ciclos (Lockey *et al.*, 1998) (**Figura I.7.A**). El **umbral de detección** (*threshold*) se sitúa por encima de la **fluorescencia basal** (*baseline*) emitida en los primeros ciclos (normalmente entre el 3º y el 15º) y que se corresponde con el ruido de fondo. El punto en el cual la gráfica (*amplification plot*) atraviesa este umbral de detección se conoce como C_T (*Cycle Threshold*), y suele estar situado entre los ciclos 15 y 30. La C_T se define como el número de ciclos de PCR necesarios para que la fluorescencia supere un determinado umbral de detección y se refleje un resultado positivo. La cantidad de ADN presente en una muestra se calcula interpolando el valor de C_T obtenido en una curva de valores de C_T generados a partir de cantidades de ADN conocidas. A mayor valor de C_T , menor será la cantidad de ADN presente en la muestra, pues con poca cantidad de ADN harán falta más ciclos de PCR para superar el umbral de detección (**Figura I.7.B**).

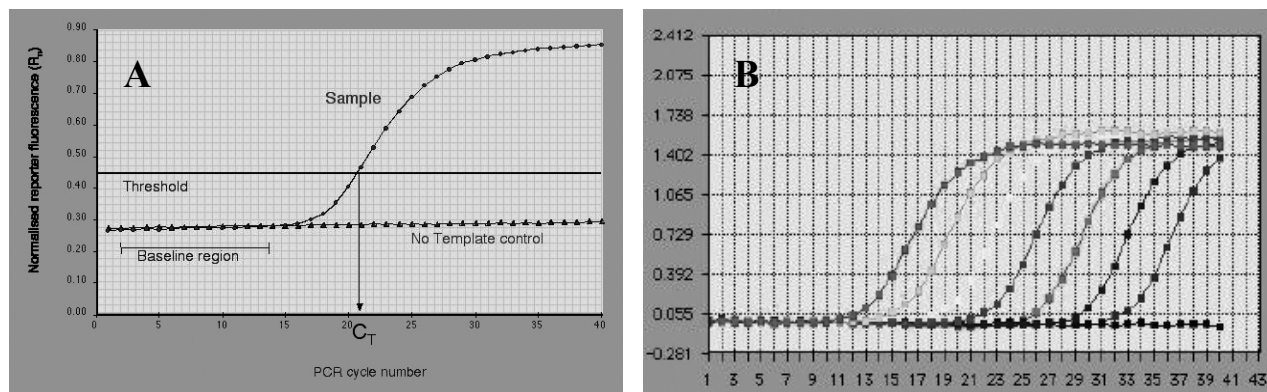


Figura 1.7 Curvas de amplificación (*amplification plots*) de un sistema de Q-PCR. **(A)** Elementos de una curva de amplificación: fluorescencia basal (*baseline*), umbral de detección (*threshold*) y C_T (*Cycle Threshold*). **(B)** Curvas de amplificación de cantidades decrecientes (de izquierda a derecha) de ADN molde.

I.3.4.2.1. Tecnologías para la detección del producto de amplificación por PCR cuantitativa en tiempo-real

En la actualidad, se han diseñado varias estrategias que permiten el seguimiento de la acumulación del producto de amplificación. Todas ellas se fundamentan en la detección de señales de fluorescencia y se agrupan en función de la especificidad por la secuencia diana.

(a) Marcadores de ADN

Usar marcadores de ADN permite que muchas moléculas del marcador se unan a una única molécula de ADN. Esto aumenta la sensibilidad para detectar los productos de la amplificación. El nivel de la señal dependerá de la longitud del amplicón de ADN producido durante la reacción de PCR. Así, si las eficiencias de amplificación son iguales, un producto más largo proporcionará más señal que otro más corto. En esto se diferencian de las sondas fluorescentes, donde un solo fluorocromo se libera por cada molécula de ADN amplificada, independientemente de su longitud.

Otra ventaja de usar marcadores de ADN para Q-PCR es que emite señal con cualquier ADN de doble cadena amplificado durante la PCR. Esto proporciona una mayor *flexibilidad*, ya que permiten detectar cualquier producto de amplificación. Por lo tanto, cualquier amplificación por PCR puede ser monitorizada simplemente añadiendo el marcador de ADN junto al resto de reactivos de la PCR. El mayor inconveniente es que producen señal tanto el producto específico como el no específico, aumentando el riesgo de aparición de falsos positivos (Schnerr *et al.*, 2001). Un ejemplo de amplificación inespecífica son los “*primer-dimers*”, y se refiere a moléculas

que resultan de la extensión de un *primer* que utiliza otro *primer* como molde. Estas moléculas no suelen interferir con la cuantificación de secuencias diana, a menos que éstas estén en bajo número de copias (Higuchi & Watson, 1999), pero sí reducen la sensibilidad del sistema. Generalmente, para evitar amplificaciones inespecíficas se suelen establecer condiciones de hibridación más restrictivas en la reacción.

Inicialmente, se empleó el agente intercalante *bromuro de etidio* (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993) para detectar la cantidad de ADN que se formaba en cada ciclo de reacción, y con posterioridad se comenzaron a utilizar *Hoeschst 33258* (Searle & Embrey, 1990), *SYBR[®] Green I* (Schneeberger *et al.*, 1995) y *YOPRO-1* (Ririe *et al.*, 1997).

El **SYBR[®] Green I** es uno de los marcadores de ADN más utilizados en Q-PCR. Proporciona una mayor sensibilidad que el bromuro de etidio. El mecanismo de unión del SYBR[®] Green I al ADN (intercalante vs. unión al surco menor del ADN) todavía no está muy claro (Zipper *et al.*, 2004). Se une preferentemente al ADN de doble cadena. Al unirse al ADN de doble cadena recién sintetizado en cada ciclo de PCR, este reactivo emite una fluorescencia cuando se ilumina o irradia con luz o energía electromagnética, proporcional a la concentración de ADN. El producto que se está formando en cada ronda de amplificación puede ser visualizado de forma continua. Además, permite distinguir fácilmente las señales obtenidas a partir de distintos productos de PCR: unos fragmentos pueden distinguirse de otros a partir de sus distintas *temperaturas de melting*.

Cuando se emplean marcadores de ADN, según aumenta la especificidad de amplificación, mejora la sensibilidad de la cuantificación, que está por debajo de las 10 copias de molécula diana con un coeficiente de variación de más de un 34% con *SYBR[®] Green I* (Morrison *et al.*, 1998). En esta tecnología, la amplificación de una molécula diana específica se puede confirmar de dos formas:

- **Nivel de fluorescencia en la fase “plateau”**

En condiciones adecuadas, el nivel de fluorescencia alcanzado en la fase “plateau” es proporcional al tamaño del amplicón. Entonces, cualquier amplificación distinta al producto de PCR del tamaño esperado da como resultado un inesperado aumento o descenso de la señal de fluorescencia en el “plateau” (Higuchi *et al.*, 1993).

- **Temperatura de desnaturalización o *melting***

Dado que la *temperatura de desnaturalización* o *melting* del ADN depende del contenido en guanina-citosina, de la longitud y de la secuencia, es posible distinguir los productos de amplificación en función de sus *temperaturas de melting*. La mayoría de los marcadores sólo interaccionan con moléculas de ADN de doble cadena, de modo que cuando las moléculas están desnaturalizadas el marcador de ADN no fluoresce (Bellin *et al.*, 2001). Se puede observar el decrecimiento de la señal de fluorescencia mediante desnaturalización lenta de los productos obtenidos por PCR. Los datos de fluorescencia que se obtienen en función de la temperatura aplicada, se corrigen restando el efecto de la fluorescencia de fondo y se convierten en picos de desnaturalización representando la primera derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura (dF/dT) frente a la temperatura (T) (**Figura I.8**). De este modo es posible resolver productos de amplificación que difieren en $1,5^{\circ}\text{C} - 2,0^{\circ}\text{C}$ en la *temperatura de melting* (Ririe *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 1998).

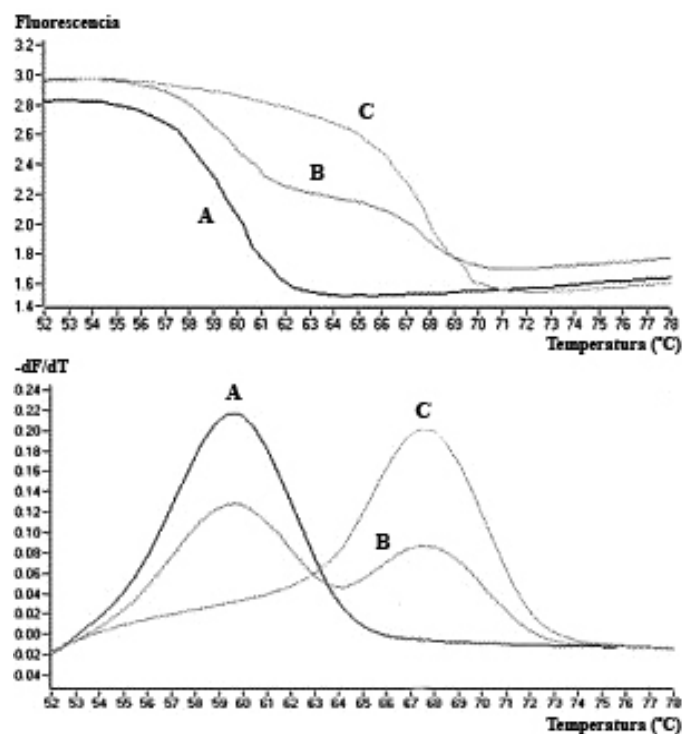


Figura I.8 Detección de mutaciones mediante el análisis de las curvas de *melting*. (**Arriba**) Curvas de *melting* de los productos de amplificación de un individuo (A) homocigoto mutante, (B) heterocigoto y (C) homocigoto salvaje. (**Abajo**) Valores negativos de la primera derivada de las curvas de *melting*, mostrando un único pico de disociación en el caso de los individuos homocigotos y dos picos de disociación en el caso del individuo heterocigoto.

(b) Sondas fluorescentes

Holland y colaboradores (1991) fueron los primeros en demostrar que la unión de una sonda al ADN molde, y gracias a la actividad exonucleasa 5' → 3' de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa), podría usarse para determinar si se está amplificando el producto diana. Además de los componentes habituales de una PCR, las reacciones de amplificación incluían una sonda marcada con ³²P en su extremo 5', además de estar bloqueada en el extremo 3' (para así evitar que funcionase como *primer*). Durante la amplificación, si la sonda hibrida con el ADN molde, se forma un sustrato que es degradado gracias a la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa, a medida que la enzima amplifica el ADN desde el *primer forward* hasta la región de la sonda. De esta forma la degradación de la sonda ocurre sólo si la secuencia diana se está amplificando. Después de la PCR, se medía la degradación de la sonda usando cromatografía de capa fina para separar las sonda degradada de la intacta (Holland *et al.*, 1991).

Los sistemas de Q-PCR se han mejorado gracias al uso de las sondas fluorescentes (Lyamichev *et al.*, 1993; Livak *et al.*, 1995). La principal ventaja frente a los marcadores de ADN (por ejemplo, el SYBR[®] Green I) es que para que se genere la señal fluorescente la sonda y la secuencia diana tienen que hibridar de forma específica. Así, con sondas fluorescentes, la amplificación no específica o los dímeros de *primers* no producen señal. Otra ventaja de las sondas fluorescentes es que se pueden marcar con distintos fluorocromos emisores. De esta forma, la amplificación de dos o más secuencias distintas de ADN se pueden detectar en una única reacción de PCR (*PCR multiplexada* o *multiplex PCR*).

Además, el desarrollo de *sondas fluorescentes* ha hecho posible eliminar el proceso post-PCR (análisis del nivel de degradación de la sonda) y el uso de radioactividad. Ejemplos de ellos son las tecnologías TaqMan[®], TaqMan[®]-MGB, Scorpion[™], Molecular Beacons[™] y FRET. En función del procedimiento empleado para obtener fluorescencia, se adoptará un momento u otro del ciclo de reacción para realizar la adquisición de la señal de fluorescencia (Wittwer *et al.*, 1997a).

- **TaqMan[®]**

La tecnología **TaqMan[®]** se basa en la hibridación específica del producto de PCR con una sonda (oligonucleótido de 20-24 bases). La sonda contiene en su extremo 5' un fluorocromo indicador, emisor o *reporter* (FAM, HEX, TET o DABCYL) y en 3' un fluorocromo neutralizador, apantallador o *quencher* (TAMRA) (Sharma & Carlson, 2000). Mientras que la sonda está intacta, la proximidad del *quencher* reduce enormemente la fluorescencia emitida por el fluorocromo emisor. Durante la PCR, si la secuencia diana se encuentra presente, la sonda hibrida específicamente entre los dos *primers*. A consecuencia de la actividad 5'→ 3' exonucleasa de la ADN polimerasa, durante la fase de polimerización de la nueva hebra en la reacción de amplificación la sonda se degrada y quedan separados físicamente fluorocromo emisor y el *quencher*, produciéndose la emisión de la luz. Según transcurren los ciclos de amplificación y se genera producto de PCR, aumenta proporcionalmente el número de sondas que hibridan con la secuencia específica y se incrementa la señal de fluorescencia (**Figura I.9.A**).

- **TaqMan[®]-MGB**

Existe una nueva generación de sondas TaqMan[®]: las **TaqMan[®]-MGB**. Estas sondas presentan dos innovaciones: (1) incorporan una molécula llamada MGB (*minor groove binder*) que se une al surco menor del ADN, incrementando la estabilidad y especificidad de la hibridación de la sonda; y (2) Emplean un "*quencher*" no fluorescente (*NFQ*) en lugar del TAMRA[™]. El MGB es una molécula pequeña, con forma de media luna, que encaja en el surco menor del ADN de doble cadena. En las sondas TaqMan[®]-MGB, el grupo MGB va unido al extremo 3', junto al "*quencher*". Cuando la sonda hibrida, la molécula MGB estabiliza la unión pegándose al surco menor de la doble cadena de ADN generada entre la sonda y la secuencia diana. Esta característica ha permitido el diseño de sondas de menor tamaño, con una longitud comprendida entre 13 y 20 pb, la mitad que una sonda estándar. Por otra parte, las sondas TaqMan[®]-MGB usan un "*quencher*" no fluorescente, también conocido como "*quencher oscuro*". Este "*quencher*" no fluorescente es una molécula que actúa como un aceptor de transferencia energética de un "*reporter*", pero que no emite señal fluorescente detectable por sí misma. La ventaja es que se emite una señal más limpia y con menos fondo fluorescente procedente de la reacción, mejorando la discriminación y facilitando la interpretación de los datos. Las principales ventajas de las sondas MGB cuando se emplean en PCR cuantitativa en tiempo real, se deben a su mayor especificidad de hibridación, que permite una mayor discriminación, y a su pequeño tamaño, que facilita el diseño de ensayos y la reducción del tamaño del amplicón, lo que mejora la fiabilidad del ensayo.

- **Scorpion™**

La tecnología **Scorpion™**, emplea un *primer* que contiene en su extremo 5' un *quencher* que está unido a un fluoróforo mediante un “*hairpin-loop*” en el extremo 5'. Durante la amplificación, después de la fase de extensión del *primer*, la secuencia del “*hairpin-loop*” hibrida específicamente con una secuencia complementaria dentro de la misma molécula de ADN sintetizada de novo. Esta hibridación provoca la apertura del “*hairpin-loop*”, el fluoróforo se aleja del *quencher* y emite luz (Whitcombe *et al.*, 1999). La señal de fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad de producto que se genera en el curso de la reacción de amplificación (**Figura I.9.B**).

- **Molecular Beacons™**

La tecnología **Molecular Beacons™** emplea sondas que contienen una estructura secundaria de “*stem-loop*” con un fluoróforo y un *quencher* en cada extremo. En condiciones normales, esta estructura mantiene al fluoróforo y al *quencher* juntos de manera que los fotones que emite el fluoróforo los absorbe el *quencher*. Cuando esta estructura se encuentra con una secuencia complementaria, se despliega e hibrida con ella. Entonces el fluoróforo se separa del *quencher* y emite fluorescencia (Tyagi & Kramer, 1996; Tapp *et al.*, 2000). Al igual que las tecnologías anteriores, la luz emitida por fluorescencia será directamente proporcional a la cantidad de amplicón generado durante la reacción (**Figura I.9.C**).

- **FRET**

La tecnología **FRET** (*Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia*) usa sondas de hibridación y se basa en la emisión de luz mediante transferencia de energía de resonancia. El principio consiste en que cuando un fluoróforo donador es excitado por una fuente de luz externa, emite luz que es absorbida por un segundo fluoróforo próximo a él, denominado aceptor. Este aceptor emite fluorescencia a una longitud de onda distinta del donador. Para trasladar este principio a PCR en tiempo real, se necesitan dos sondas, una sonda contiene un fluoróforo donador en 3' y la otra sonda contiene un fluoróforo aceptor en 5'. Únicamente cuando las dos sondas hibridan de forma adyacente dentro de la secuencia del amplicón se produce emisión de fluorescencia (**Figura I.9.D**). A medida que se incrementa la cantidad de producto de PCR, se incrementa igualmente la cantidad de las dos sondas que hibridan y producen señal de fluorescencia. Así, la señal de fluorescencia será directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR específico. Si el amplicón no es específico, no se producirá hibridación de las sondas y por tanto no habrá reacción.

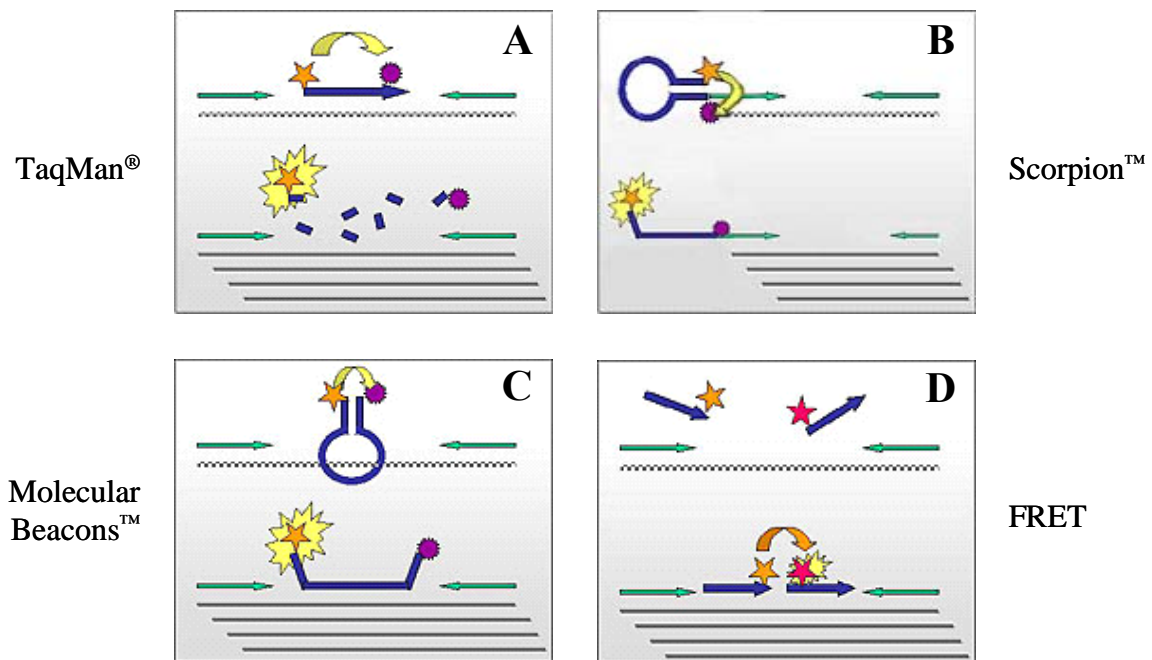


Figura I.9 Esquema de distintas alternativas empleadas para producir la emisión de fluorescencia. (A) Sondas TaqMan[®]; (B) *Primers Scorpion[™]*; (C) *Molecular Beacons[™]*; (D) Tecnología FRET.

I.3.4.2.2. Ventajas e inconvenientes de la PCR Cuantitativa en Tiempo-Real

Algunas de las ventajas de la Q-PCR frente a los otros métodos de PCR cuantitativa son:

- La Q-PCR es un ensayo en tubo cerrado, es decir, no hay que manipular la muestra una vez amplificada, lo que reduce de forma importante la posible contaminación ambiental. Además, al no ser necesario el análisis en geles de agarosa, se evita la manipulación post-PCR, importante fuente de contaminaciones cruzadas.
- La Q-PCR es 10 veces más sensible que la QC-PCR. Además, el intervalo de concentraciones que se puede ensayar es mayor en la Q-PCR que en la QC-PCR (Morrison *et al.*, 1998).
- En la Q-PCR es posible emplear sondas marcadas con distintos fluoróforos, lo que permite detectar más de una secuencia diana en una misma reacción.

- Gracias al desarrollo de nuevos instrumentos, la técnica de Q-PCR cuenta con una alta capacidad de procesamiento y tiempos de análisis muy cortos (Wittwer *et al.*, 1997b). El proceso global requiere de 1 a 2 h de extracción del ADN, 2 h de PCR, 20 min de lectura de fluorescencia y 10 min de análisis de los datos obtenidos. Además, el uso de placas de 96 pocillos permite analizar hasta 20 muestras a la vez.
- La Q-PCR se puede integrar en cadenas automáticas de producción (automatizando el proceso de extracción del ADN, y enlazando todos los datos del proceso con un sistema computerizado, se puede almacenar y tener a mano toda la información del control de calidad).

A pesar de que la aplicación de esta técnica está ganando importancia, muchos laboratorios de biología molecular todavía no disponen de la instrumentación necesaria. Además, el empleo de sondas fluorescentes encarece mucho el precio por análisis.

Por otra parte, un estudio reciente sobre validación de un método Q-PCR para *Soja Roundup Ready* en muestras procesadas ha puesto de manifiesto una insuficiente reproducibilidad en los resultados obtenidos por distintos laboratorios, con coeficientes de variación superiores al 25% (Tender No. XXIV/98/A3/001).

I.3.5. Aplicaciones de la PCR en la detección y/o cuantificación de ADN de trigo, cebada y centeno en alimentos

En los últimos años se han desarrollado varios métodos no inmunológicos de detección (cualitativa y cuantitativa) del ADN de los cereales que contienen gluten: trigo, cebada y centeno (**Tabla I.3**). Todos estos métodos están basados en la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* o PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*).

Tabla I.3 Comparación de las características de los distintos sistemas de PCR publicados en la bibliografía y relacionados con la detección/cuantificación de ADN de trigo, cebada y centeno en alimentos.

Publicación	Sistema de PCR	Cereal	Secuencia diana o <i>target</i>	Tamaño del amplicón (pb)	Sensibilidad (pg ADN)
Koppel <i>et al.</i> , 1998	PCR + Geles agarosa	Trigo	<i>Intergén ARNr 25S-18S</i>	109	2-20
Dahinden <i>et al.</i> , 2001	QC-PCR	Trigo	<i>Intrón del gen cloroplastidial trnL</i>	201	20
		Centeno		201	2
		Cebada		196	2
von Buren <i>et al.</i> , 2001	QC-PCR	Trigo blando	γ -gliadina	236	1.000
Alary <i>et al.</i> , 2002	Q-PCR (TaqMan™)	Trigo	<i>Proteína de transferencia de lípidos</i>	61	1.000
		Trigo blando	<i>Puroindolina B</i>	63	1.000
Sandberg <i>et al.</i> , 2003	Q-PCR (SYBR® Green I)	Trigo	ω -gliadina	181	5-50
		Centeno	ω -secalina	181	5-50
		Cebada	<i>B1-hordeína</i>	164	5-50
		Avena	<i>Avenina</i>	104	5-50
Terzi <i>et al.</i> , 2003	Q-PCR (TaqMan™)	Trigo	<i>Glutenina de bajo peso molecular</i>	101	ND
		Trigo blando	γ -gliadina	101	1.000
Terzi <i>et al.</i> , 2004	Q-PCR (SYBR® Green I y TaqMan™)	Centeno	<i>O-metiltransferasa</i>	101	150
Hernández <i>et al.</i> , 2005	Q-PCR (TaqMan™)	Trigo	<i>RALiasa</i>	68	ND
		Trigo blando	<i>Acetil-CoA carboxilasa</i>	93	33,1
		Cebada	γ -hordeína	73	10,1
Ronning <i>et al.</i> , 2006	Q-PCR (TaqMan™)	Trigo Cebada	<i>Serina/treonina protein quinasa</i>	87	87,5 53,4

ND: No Determinado

I.3.5.1. Sistemas basados en PCR cualitativa

El Laboratorio de Bromatología de la Universidad de Berne (Suiza) utilizó por primera vez la PCR combinada con el análisis en geles de agarosa para la detección de contaminaciones de trigo en alimentos (Koppel *et al.*, 1998). Este sistema fue probado en granos/copos de avena y alimentos de avena procesados industrialmente. Todas estas muestras se analizaron en paralelo con el ELISA- ω Sándwich ([apartado I.2.2.1.1](#)). Utilizando una harina de avena negativa por los sistemas de PCR y ELISA, y contaminada con cantidades conocidas de harina de trigo, se demostró que el sistema de PCR desarrollado era aproximadamente diez veces más sensible que el sistema de ELISA (Koppel *et al.*, 1998).

En 2003 se publicaron cuatro sistemas individuales de **Q-PCR** basados en el fluoróforo *SYBR*[®] *Green I*: uno para la detección de contaminaciones de trigo, otro de centeno, otro de cebada y otro de avena (Sandberg *et al.*, 2003). Estos cuatro sistemas no cuantifican el ADN de estos cereales, sino que simplemente determinan el origen de la contaminación a través de la *temperatura de melting* (T_m) de los productos de amplificación (Trigo → 84,3°C; Centeno → 81,5°C; Cebada → 85,0°C; Avena → 81,2°C). Con los sistemas desarrollados de Q-PCR se analizaron distintos tipos de alimentos (principalmente alimentos de avena). Los resultados obtenidos se compararon con los niveles de gliadinas cuantificados con el método de ELISA- ω Sándwich. Los sistemas de Q-PCR se correlacionaron bastante bien con el método inmunológico (Sandberg *et al.*, 2003).

I.3.5.2. Sistemas basados en PCR cuantitativa

El Laboratorio de Bromatología de la Universidad de Berne utilizó por primera vez la **QC-PCR** para la detección/cuantificación simultánea de contaminaciones de trigo, centeno y cebada en alimentos “sin-gluten” (Dahinden *et al.*, 2001). El ELISA- ω Sándwich se utilizó como técnica complementaria. Ambos sistemas (inmunológico vs no-inmunológico) dieron resultados idénticos en la mayoría de los alimentos “sin-gluten” analizados (Dahinden *et al.*, 2001).

En 2002 se publicó el primer sistema de Q-PCR basado en las sondas *TaqMan*[®] para la detección y cuantificación de ADN de trigo en alimentos (Alary *et al.*, 2002). Dos años más tarde, Terzi y colaboradores desarrollaron otros dos sistemas de Q-PCR –uno basado en el fluoróforo *SYBR*[®] *Green I* y el otro en las sondas *TaqMan*[®]– para la detección y cuantificación de ADN de centeno (Terzi *et al.*, 2004).

Recientemente, se han publicado dos sistemas individuales de Q-PCR para la detección y cuantificación de trigo y cebada (Hernandez *et al.*, 2005). El sistema de Q-PCR de cebada fue adaptado a PCR convencional (a punto final) combinada con geles de agarosa, con el objetivo de disponer de un sistema *cualitativo* de detección de ADN de cebada. Sin embargo no se pudo hacer lo mismo con el sistema de Q-PCR de trigo, ya que por geles de agarosa se detectaba ADN de trigo y de centeno con la misma sensibilidad.

También se ha publicado un sistema *duplex* de Q-PCR para la detección y cuantificación simultánea de ADN de trigo y cebada (Ronning *et al.*, 2006). Con este sistema optimizado se analizaron 10 muestras de alimentos, llegando a la conclusión de que el método desarrollado era adecuado para detectar y cuantificar ADN de trigo y cebada en *Organismos Modificados Genéticamente* (GMO) y en cualquier otro tipo de alimento.

I.3.5.3. Detección y/o cuantificación de ADN de trigo blando (*Triticum aestivum*) en alimentos de pasta elaborados con trigo duro (*Triticum durum*)

El hecho de que el trigo blando (*Triticum aestivum*) se haya comercializado durante muchos años a un precio considerablemente inferior al del trigo duro (*Triticum durum*) ha funcionado como incentivo para que muchos alimentos de pasta seca, supuestamente elaborados con 100% trigo duro, se adulteren con distintas cantidades de trigo blando.

En los últimos años se han desarrollado varios sistemas de detección de ADN de trigo blando en alimentos basados en la **PCR** y el análisis con **geles de agarosa**. La mayoría de los sistemas desarrollados son *cualitativos* (Bryan *et al.*, 1998; Arlorio *et al.*, 2003; Tilley, 2004), con unos límites de detección (LOD) entre 500 y 1.000 pg de ADN de *T. aestivum*. Sin embargo, también se ha desarrollado un sistema de QC-PCR para la detección/cuantificación de ADN de trigo blando en harinas y alimentos a base de trigo espelta (von Buren *et al.*, 2001).

Sin embargo, los métodos que tienen más expectativas de futuro por ser los más *eficaces*, *rápidos* y *automatizados* sistemas de cuantificación de material genético se basan en la tecnología de la **Q-PCR** ([apartado I.3.4.2](#)). En este sentido se han desarrollado varios sistemas de Q-PCR, todos ellos basados en las sondas TaqMan[®], para la detección y cuantificación de adulteraciones de trigo blando en alimentos de pasta (Alary *et al.*, 2002; Terzi *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 2005).

Capítulo II. Objetivos

1. El objetivo principal de este estudio será desarrollar y optimizar tres sistemas individuales de detección y cuantificación de ADN de (i) *trigo*, (ii) *cebada* y (iii) *centeno* en alimentos “sin-gluten”, basados en la tecnología de la *PCR cuantitativa en tiempo-real (Q-PCR)*, el fluoróforo *SYBR® Green I* y/o las *sondas TaqMan®*. Estos sistemas individuales de Q-PCR, a diferencia de los actuales métodos inmunológicos de *ELISA* y *Western Blot*, permitirán caracterizar el tipo de contaminación presente en los alimentos “sin-gluten” contaminados con mezclas de los tres cereales tóxicos para los enfermos celiacos (*trigo*, *cebada* y *centeno*).
2. Se intentará desarrollar un sistema simultáneo de Q-PCR que permita detectar y cuantificar *a la vez* ADN de *trigo*, *cebada* y *centeno*, de una manera similar a como lo hace el *ELISA-R5* detectando *gluten* de *trigo*, *cebada* y *centeno* simultáneamente.
3. Se hará un estudio comparativo entre los valores de ADN de *trigo*, *cebada* y *centeno* cuantificados con los tres sistemas individuales y con el sistema simultáneo. Se determinará si el sistema simultáneo es capaz de sustituir a los tres sistemas individuales, con el objeto de disponer de un único sistema que detecte *a la vez* ADN de estos tres cereales.
4. Se preparará un *estándar* de ADN para cada uno de los cuatro sistemas de Q-PCR. Para ello, (i) se purificarán los extractos de ADN de distintas variedades de *trigo*, *cebada* y *centeno*, (ii) se verificará que los sistemas de Q-PCR amplifican por igual el ADN procedente de las distintas variedades y (iii) se harán mezclas o *pools* con los extractos de ADN purificados a partir de las respectivas variedades de cada sistema de Q-PCR.
5. Se desarrollará y optimizará un sistema de extracción de ADN en alimentos capaz de extraer la totalidad del ADN con el suficiente grado de *pureza* como para poder ser utilizado directamente en los sistemas de Q-PCR, sin necesidad de un paso posterior de purificación.
6. Se seleccionarán las mejores placas, *films* adhesivos y reactivos, con el objeto de que los sistemas de Q-PCR desarrollados en este estudio se lleven a cabo en las mejores condiciones, tanto a nivel de *reproducibilidad* como de *costes*.
7. Se desarrollará y optimizará un sistema barato y universal de reactivos de Q-PCR, basado en el fluoróforo *SYBR® Green I*, como alternativa económica a los caros *kits* comerciales “*ready-to-use*” (“listos para usar”).

8. Se pondrá a punto un sistema de detección de ADN en geles de agarosa para la visualización de los productos de amplificación de los cuatro sistemas de Q-PCR. Este sistema estará basado en el fluoróforo *SYBR[®] Green I*, marcador de ADN alternativo y mucho más sensible que el *bromuro de etidio*.
9. Teniendo en cuenta que un porcentaje importante de los alimentos para celíacos están elaborados a partir de harinas de cereales “no tóxicos” (tipo maíz y/o arroz) se determinará si en los alimentos contaminados con gluten, el ADN de estos cereales, presente en altas concentraciones, interfiere en la cuantificación del ADN de trigo, cebada y/o centeno, presente a niveles de *trazas*.
10. Será necesario conocer si los sistemas de Q-PCR desarrollados en este estudio son capaces de cuantificar con la misma eficiencia el ADN extraído de alimentos procesados y no procesados con calor, así como de los tratados con enzimas proteolíticas.
11. Será de gran interés estudiar el efecto de los ingredientes de los alimentos (a veces, con matrices muy complejas) sobre la cuantificación de los diferentes sistemas de Q-PCR. Según el tipo de alimento, podría ser necesario llevar a cabo alguna modificación en el sistema de extracción, para obtener un ADN de mayor *pureza*.
12. Se determinará si existe una *correlación lineal* entre los niveles de **prolaminas** de trigo, cebada y centeno (cuantificados con el método de ELISA-R5 Sándwich) y los niveles de **ADN** de trigo, cebada y centeno (utilizando el sistema simultáneo de Q-PCR) en los alimentos “sin-gluten” contaminados con trigo, cebada, centeno o mezclas de estos tres cereales.

Capítulo III. Materiales y Métodos

III.1. MUESTRAS

Una vez optimizados los distintos sistemas de Q-PCR se procedió a la cuantificación de los niveles de contaminación de trigo, cebada y/o centeno en más de **300 muestras**. La mayoría eran alimentos “sin-gluten”, de empresas españolas y europeas.

III.1.1. Alimentos

No sólo se han analizado harinas [de avena (*Avena sativa*), maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), soja (*Glycine max*), alforfón (*Fagopyrum esculentum*), altramuz (*Lupinus albus*)] sino también alimentos con matrices complejas, como alimentos ricos en polifenoles (chocolates), almidones, carnes (hamburguesas, morcillas...), caramelos (*Chupa-Chups*, gominolas...), etc.

También se han analizado productos hidrolizados (cervezas, siropes...) y tratados con calor (harinas tostadas de maíz y soja, pan, galletas, copos para el desayuno...).

En todos los casos se llevó a cabo la extracción del ADN, la cuantificación por Q-PCR del ADN de trigo, cebada y/o centeno, y el análisis de las secuencias amplificadas.

III.1.2. Controles de especificidad

Como controles de especificidad se usaron las harinas de las semillas de las siguientes especies vegetales: Trigo (*Triticum aestivum*), triticale (*Triticosecale spp*), centeno (*Secale cereale*), cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), soja (*Glycine max*), alforfón (*Fagopyrum esculentum*), altramuz (*Lupinus albus*). Todas estas harinas fueron previamente analizadas por ELISA-R5 Sándwich ([apartado III.7.4](#)) con el objetivo de determinar su contenido en prolaminas. Como se puede observar en la [Tabla III.1](#), el trigo, triticale, centeno y cebada dieron unos niveles de prolaminas muy altos (entre 6,9 y 15,7 g por 100 g de harina), mientras que el maíz, arroz, avena, soja y alforfón dieron negativo, con niveles de prolaminas por debajo del límite de detección del ELISA-R5 Sándwich (< 1,5 ppm).

Tabla III.1 Niveles de prolaminas (ppm), cuantificados por el ELISA-R5 Sándwich, de las muestras (harinas) utilizadas como controles de especificidad de los sistemas de Q-PCR.

Muestra	Prolaminas (ppm)
Trigo₁ (<i>Triticum aestivum</i> var. Apuesto)	95.000
Trigo₂ (<i>Triticum aestivum</i> var. Amon)	80.000
Trigo₃ (<i>Triticum durum</i> var. Araldun)	87.700
Triticale₁ (<i>Triticosecale</i> spp var. S2)	91.800
Triticale₂ (<i>Triticosecale</i> spp var. S3)	106.675
Centeno (<i>Secale cereale</i> var. Merkator)	69.000
Cebada₁ (<i>Hordeum vulgare</i> var. Grosso)	157.000
Cebada₂ (<i>Hordeum vulgare</i> var. Alpha)	134.325
Avena (<i>Avena sativa</i>)	< 1,5
Maíz (<i>Zea mays</i>)	< 1,5
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	< 1,5
Soja (<i>Glycine max</i>)	< 1,5
Alforfón (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	< 1,5
Altramuz (<i>Lupinus albus</i>)	< 1,5

III.1.3. Variedades utilizadas en los estándares de ADN

Para la elaboración del estándar de ADN de **trigo** se emplearon las harinas de veinticinco variedades distintas: diez de **trigo duro** (*Triticum durum* var. Anento, Artena, Angre, Anton, Regallo, Cibeles, Aldeano, Jabato, Araldun y Roqueño) y quince de **trigo blando** (*Triticum aestivum* var. Abanto, Amiro, Admiral, Festin, Ampuero, Adalid, Ritmo, Bandit, Tambor, Vivant, Bussard, Apuesto, Recital, Almonte y Amon).

En el caso de los estándares de ADN de **cebada** y **centeno**, se utilizaron las harinas de quince variedades de **cebada** (*Hordeum vulgare* var. Alpha, ReINETTE, Grosso, Hassan, Icare, Cresta, Cameo, Volga, Tabaiba, Clarine, Scarlett, County, Pewter, Prestige y Vanessa) y cuatro variedades de **centeno** (*Secale cereale* var. Mercator, Macada, Retamar y Petkus).

III.1.4. Muestras de avena

Las 47 muestras de avena analizadas en el [apartado IV.7.4](#) fueron amablemente cedidas por el Dr. Markku Mäki, profesor de investigación de la Universidad de Tampere (Finlandia). Consistían en harinas y alimentos de avena (copos, cereales para el desayuno, papillas...) adquiridos en diversas tiendas de Finlandia. Todos ellos estaban etiquetados como alimentos “sin-gluten” y su consumo está muy extendido dentro del colectivo celiaco de Finlandia, así como de otros países nórdicos (como Suecia o Dinamarca).

III.1.5. Muestras de teff

Las nueve muestras de teff analizadas en el [apartado IV.7.6](#) fueron enviadas por la *Asociación de Celiacos de Holanda* (NCV). Consistían en dos mezclas para hornear, tres mezclas integrales para hornear, una harina blanca (teff puro) y tres harinas integrales (teff puro). Todas ellas habían causado alguna molestia intestinal a uno o varios enfermos celiacos. Además de enviarnos las muestras causantes de tales molestias, la NCV también adjuntó un listado de los síntomas intestinales producidos por el consumo de dichos productos de teff.

III.2. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS

III.2.1. Homogeneización

Las **muestras sólidas** (granos de cereales, galletas, copos para el desayuno...) fueron trituradas con la ayuda de un molinillo de café (MC0360, UFESA). Se cogió la suficiente cantidad de muestra como para poder ser triturada con facilidad (~50 g).

Las **muestras líquidas** (por ejemplo, las cervezas) se agitaron unos segundos (10-30 seg) con la ayuda de un *vortex* y se pesaron utilizando una pipeta automática con punta con filtro. Para pesar líquidos muy viscosos, como los siropes, se utilizaron puntas con filtro a modo de espátulas.

Las muestras se almacenaron en tubos de propileno de 10 ml y, dependiendo del alimento, se conservaron a 4°C o a temperatura ambiente.

III.2.2. Métodos de extracción de ADN

En esta Tesis Doctoral se han probado tres métodos distintos de extracción de ADN: uno comercial [*PrepMan™ Ultra* (Applied Biosystems, Foster City, USA)] y dos basados en protocolos publicados en la bibliografía [*Método del CTAB* (Murray & Thompson, 1980) y *método Wizard®* (Zimmermann *et al.*, 1998b)].

III.2.2.1. PrepMan™ Ultra

Se pesaron 20 mg de muestra homogenizada en un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml y se añadieron 400 µl de reactivo *PrepMan™ Ultra* (Applied Biosystems). Se agitó unos segundos con la ayuda de un *vortex* (10-30 seg) hasta resuspender completamente la muestra. Entonces se calentó la mezcla 10 min a 100°C en un bloque térmico *Thermomixer comfort* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con agitación (1.400 rpm). Una vez finalizadas las incubaciones, se dejaron enfriar las muestras 10 min a 4°C. Luego se centrifugaron los tubos 15 min a 13.200 rpm/16.000 g (temperatura ambiente). Con una pipeta automática p200, y evitando aspirar parte del precipitado, se transfirieron los sobrenadantes (extractos de ADN de las muestras) a nuevos tubos *Eppendorf* de 0,5 ml y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

III.2.2.2. Método del CTAB

Se pesaron 20 mg de muestra homogenizada en un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml y se añadieron, en este orden, 161,3 µl de **tampón de extracción** [Tris-HCl 100 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; Merck, Darmstadt, Alemania) pH 7,5, sorbitol 0,35 M (Sigma-Aldrich), EDTA 5 mM (Sigma-Aldrich)], 225,8 µl de **tampón de lisis** [Tris-HCl 200 mM pH 7,5, NaCl 2 M (Sigma-Aldrich), EDTA 50 mM, CTAB 2% (w/v) (Merck)] y 12,9 µl de N-Lauroylsarcosina 10% (w/v) (Merck). Se agitó todo suavemente (mediante inversión) hasta resuspender completamente la muestra. Entonces se calentó la mezcla 30 min a 60°C en un bloque térmico *Thermomixer comfort* con agitación (1.400 rpm). Estos lisados celulares podían ser purificados mediante precipitación con isopropanol (apartado III.2.2.2.1) o utilizados directamente sin purificar, simplemente centrifugando y rescatando el sobrenadante (apartado III.2.2.2.2).

III.2.2.2.1. Fase de purificación: Precipitación con isopropanol

Una vez finalizadas las incubaciones, se añadió 1 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Se agitaron unos segundos con la ayuda de un *vortex* (10-30 seg) hasta resuspender

completamente las muestras. Luego se centrifugaron los tubos a 4°C durante 15 min a 13.200 rpm/16.000 g. Se obtuvieron tres fases: (a) una superior, donde se encontraba el ADN, (b) una capa intermedia semisólida y (c) una capa con partículas en solución en el fondo. Con una pipeta automática p1000, y evitando aspirar parte de la fase intermedia, se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos *Eppendorf* de 1,5 ml. Se precipitó el ADN con un volumen de isopropanol 100% y se volvieron a centrifugar los tubos a 4°C durante 15 min a 13.200 rpm/16.000 g. Se desecharon los sobrenadantes, se lavaron los precipitados con 700 µL de etanol 70% frío y se secaron en un evaporador-calentador rotatorio a vacío *UNIVAPO 100 H* (UniEquip, Munich, Alemania). Una vez secos (aproximadamente 5 min), se diluyeron en 400 µL de H₂O milli-Q estéril precalentada a 65°C. Se incubaron durante 10 min a 65°C en un bloque térmico *Thermomixer comfort* con agitación (1.400 rpm) y finalmente se almacenaron a 4°C hasta su uso.

III.2.2.2. Sin fase de purificación

Una vez finalizadas las incubaciones, se dejaron enfriar las muestras 10 min a 4°C. Luego se centrifugaron los tubos 15 min a 13.200 rpm/16.000 g (temperatura ambiente). Con una pipeta automática p200, y evitando aspirar parte del precipitado, se transfirieron los sobrenadantes (extractos de ADN de las muestras) a nuevos tubos *Eppendorf* de 0,5 ml y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

III.2.2.3. Método *Wizard*[®]

Se pesaron 20 mg de muestra homogenizada en un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml y se añadieron, en este orden, 344 µl de **tampón de extracción TNE** [TRIS-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, SDS 1% (w/v) (BDH, Poole, UK)], 16 µl de proteinasa K 20 mg/ml (Merck) y 40 µl de clorhidrato de guanidina 5 M (Fluka, Buchs, Suiza). Se agitó unos segundos con la ayuda de un *vortex* (10-30 seg) hasta resuspender completamente la muestra. Entonces se calentó la mezcla 3 h a 60°C en un bloque térmico *Thermomixer comfort* con agitación (1.400 rpm). Una vez finalizadas las incubaciones, se dejaron enfriar las muestras 10 min a 4°C. Luego se centrifugaron los tubos 15 min a 13.200 rpm/16.000 g (temperatura ambiente). Con una pipeta automática p200, y evitando aspirar parte del precipitado, se transfirieron los sobrenadantes (extractos de ADN de las muestras) a nuevos tubos *Eppendorf* de 0,5 ml y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Fase de purificación: Columnas *Wizard*[®]

Los extractos de ADN se purificaron con columnas *Wizard*[®] *Plus Minipreps* (Promega, Madison, USA) siguiendo el protocolo descrito en el [apartado III.3.2.1](#).

III.2.2.4. Desarrollo y optimización de un nuevo método de extracción de ADN

A partir del método *Wizard*[®] sin fase de purificación ([apartado III.2.2.3](#)) se optimizaron una serie de variables con el objetivo de desarrollar un nuevo método de extracción de ácidos nucleicos más eficiente y rápido que el original.

Para ello se estudió el efecto de las siguientes variables sobre el rendimiento de la extracción:

- Tiempos (10, 30, 60 y 180 min) y temperaturas (60 vs 100°C) de incubación
- Volumen de los reactivos de extracción (400 vs 800 µl)
- Cantidad de muestra (5, 10 y 20 mg)
- Composición del tampón TNE (SDS 1, 2 y 4%; con y sin β-mercaptoetanol)
- Concentración final de clorhidrato de guanidina (1, 2 y 4 M)
- Concentración final de proteinasa K (0, 400, 600 y 800 µg/ml)

Las muestras empleadas en estos experimentos consistieron en una harina de una variedad de trigo duro (*Triticum durum*, variedad Aldeano) y muestras de alimentos contaminados con trigo. El ADN de estos extractos se cuantificó con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo. Los resultados se discuten en el [apartado IV.1](#).

Tras la optimización de todas estas variables, se estableció el siguiente protocolo como método de extracción estándar:

Se pesaron 20 mg de muestra homogenizada en un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml y se añadieron, en este orden, 688 µl de **tampón de extracción TNE** [Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 2mM, SDS 1% (w/v)], 32 µl de proteinasa K 20 mg/ml y 80 µl de clorhidrato de guanidina 5 M. Se agitó unos segundos con la ayuda de un *vortex* (10-30 seg) hasta resuspender

completamente la muestra. Entonces se calentó la mezcla 30 min a 100°C en un bloque térmico *Thermomixer comfort* con agitación (1.400 rpm) y una vez finalizadas las incubaciones, se dejaron enfriar las muestras 10 min a 4°C. Luego se centrifugaron los tubos 15 min a 13.200 rpm/16.000 g (temperatura ambiente) y con una pipeta automática p1000, y evitando aspirar parte del precipitado, se transfirieron los sobrenadantes (extractos de ADN de las muestras) a nuevos tubos *Eppendorf* de 1,5 ml y se almacenaron a 4°C hasta su uso. En el [apartado IV.6.1.3.2](#) se discute la estabilidad de estos extractos a 4°C.

En lo sucesivo, las extracciones de los ácidos nucleicos de las muestras se desarrollaron siguiendo el protocolo descrito en el párrafo anterior.

III.2.2.5. Extracción del ADN de alimentos que contienen polifenoles

Cuando se cuantifican los niveles de prolaminas en muestras de alimentos que contienen *polifenoles* en su composición (como, por ejemplo, el chocolate, el café o el cacao), se recomienda el uso de gelatina y polivinilpirrolidona (PVP) durante la extracción de las prolaminas con etanol 60% (como se indica en las instrucciones del kit de ELISA-R5 *RIDASCREEN® Gliadin*, de la empresa alemana *r-Biopharm*).

De forma análoga, en el procedimiento de extracción del ADN de este tipo de alimentos se utilizó gelatina de cerdo al 2,5% y PVP al 1% (w/v). Sobre los 20 mg de muestra homogeneizada se añadieron 20 mg de gelatina de cerdo (Sigma-Aldrich) y 8 mg de PVP (Sigma-Aldrich). Entonces se procedió a la extracción del ADN con el método *Wizard®*, sin fase de purificación y en las condiciones óptimas de extracción (como se describe en el [apartado III.2.2.4](#)).

III.2.2.6. Eliminación del ARN de los extractos de ácidos nucleicos

Cuando se cuantificó el contenido de ADN de los extractos con alguno de los sistemas de Q-PCR desarrollados en esta Tesis Doctoral, no se necesitó de ningún tratamiento adicional. Sin embargo, cuando se quiso cuantificar el ADN espectrofotométricamente, fue necesario someter los extractos a un tratamiento con RNasa, para así poder eliminar el ARN que pudiese interferir en la medida de las ODs a 260 y 280 nm. En este caso, se añadieron 2 µl de Ribonucleasa I "A" 1 mg/ml (Pharmacia, Uppsala, Suecia) por cada 50 µl de extracto de ADN y se incubaron en una estufa a 37°C durante 30 min.

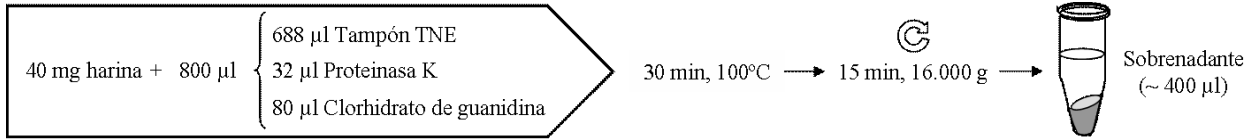
III.3. PROCESO DE ELABORACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE ADN DE LOS CUATRO SISTEMAS DE Q-PCR

El proceso de elaboración de los estándares de ADN de los sistemas individuales (trigo, cebada y centeno) y el sistema simultáneo (trigo/cebada/centeno) de Q-PCR se divide en tres etapas: (1) extracción del ADN, (2) purificación de los extractos de ADN y (3) preparación de los estándares y las curvas de calibrado (Figura III.1).

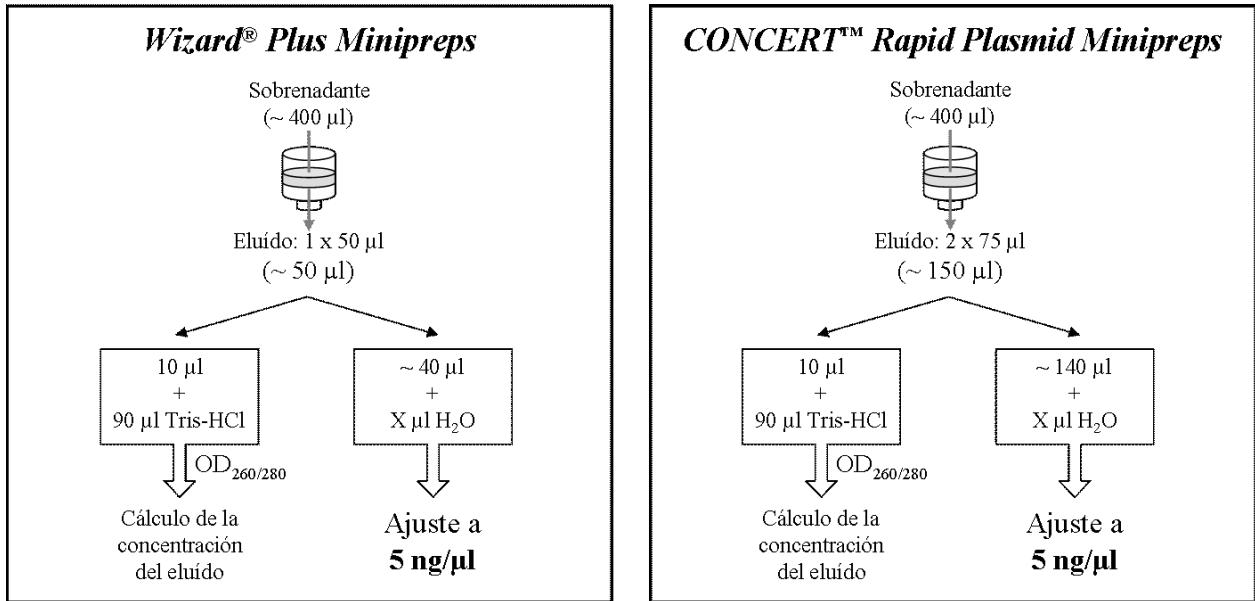
III.3.1. Extracción del ADN

La extracción del ADN de las treinta y tres harinas (veinticinco de trigo, cuatro de cebada y cuatro de centeno) se hizo con el método *Wizard*[®] sin fase de purificación, en las condiciones óptimas de extracción (como se describe en el apartado III.2.2.4), pero con 40 mg de muestra en vez de 20 mg.

1. Extracción del ADN



2. Purificación de los extractos de ADN



3. Preparación de los estándares y las curvas de calibrado

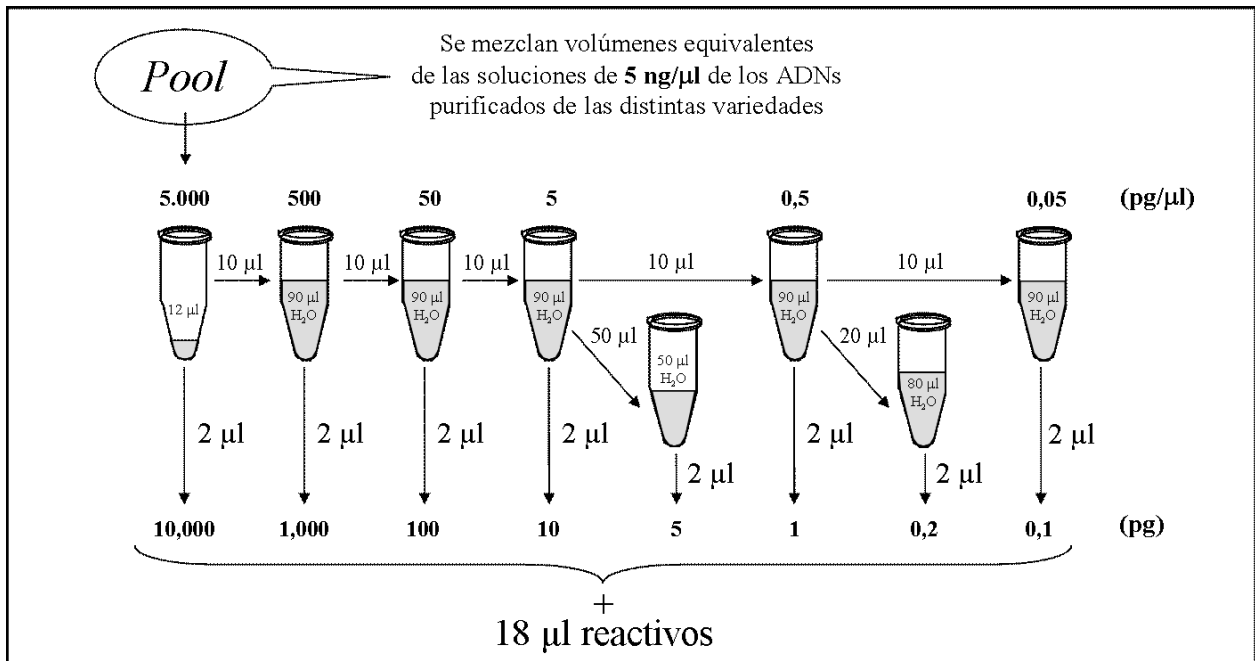


Figura III.1 Proceso de elaboración de los estándares de ADN de los sistemas individuales (trigo, cebada y centeno) y el sistema simultáneo (trigo/cebada/centeno) de Q-PCR.

III.3.2. Purificación de los extractos de ADN

Para purificar los extractos de ADN del apartado III.3.1 se utilizaron tanto columnas *Wizard*[®] *Plus Minipreps* como *CONCERT*[™] *Rapid Plasmid Minipreps* (Invitrogen, Barcelona, España). Las columnas *Wizard*[®] tienen un rendimiento de hasta 16 µg de ácidos nucleicos y las *CONCERT*[™] de hasta 30 µg (según las especificaciones de los fabricantes).

III.3.2.1. Columnas *Wizard*[®]

Se quitó el émbolo de una jeringuilla de 3 ml y se conectó a una columna. Se añadió 1 ml de resina de purificación de ADN y, sobre ésta, el extracto de ADN. Se insertó con cuidado el émbolo en la jeringuilla y se empujó suavemente toda la mezcla (resina y ADN) a través de la columna.

Luego se separó la jeringuilla de la columna y se quitó el émbolo. Se volvió a conectar la jeringuilla a la columna y se añadió 2 ml de solución de lavado. Se insertó el émbolo en la jeringuilla y se empujó suavemente la solución de lavado a través de la columna.

Se separó la jeringuilla y se colocó la columna sobre un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml. Para secar la resina, se centrifugó 2 min a 10.400 rpm/10.000 g. Se colocó la columna en un nuevo tubo *Eppendorf* de 1,5 ml, se añadieron 50 µl de agua milli-Q estéril precalentada a 80°C y se incubó 1 min a temperatura ambiente. Para eluir el ADN se centrifugó 20 seg a 10.400 rpm/10.000 g.

Por último, se añadieron 2 µl de Ribonucleasa I “A” 1 mg/ml a cada uno de los 50 µl de ADN purificado y se dejaron 30 min a 37°C.

III.3.2.2. Columnas *CONCERT*[™]

Se añadió el extracto de ADN dentro del *spin cartridge*, el cual previamente se había colocado sobre un tubo de lavado de 2 ml. Se centrifugó el conjunto (*spin cartridge* + tubo de lavado) 1 min a 11.400 rpm/12.000 g y se desechó el flujo resultante.

Se añadieron 700 µl de **Tampón de Lavado (G4)** (conteniendo etanol) dentro del *spin cartridge*. Se centrifugó 1 min a 11.400 rpm/12.000 g y se desechó el flujo. Se volvió a centrifugar 1 min a 11.400 rpm/12.000 g para eliminar el tampón de lavado residual.

Se colocó el *spin cartridge* sobre un tubo de recuperación de 1,5 ml, se añadieron 75 μ l de tampón TE directamente en el centro del *spin cartridge* y se incubó 1 min a temperatura ambiente. Para eluir el ADN se centrifugó 1 min a 11.400 rpm/12.000 g. Se volvió a repetir este último paso con otros 75 μ l de tampón TE.

Por último, se añadieron 6 μ l de Ribonucleasa I "A" 1 mg/ml a cada uno de los 150 μ l de ADN purificado y se dejaron 30 min a 37°C.

III.3.2.3. Cálculo de la concentración y pureza

La concentración y el grado de pureza de los extractos de ADN purificados a partir de treinta y tres variedades de trigo, cebada y centeno se determinaron por absorbancia (Sambrook *et al.*, 1989) en un espectrofotómetro *BioPhotometer* de Eppendorf, utilizando cubetas desechables de plástico transparente al UV (*UVette*[®], Eppendorf).

Primero se hizo una dilución 1/10 con tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,0 (10 μ l extracto ADN purificado + 90 μ l tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,0). Después se midieron en el espectrofotómetro las absorbancias a 260 nm y 280 nm. El aparato nos proporcionó directamente la **pureza** y la **concentración** de ADN de doble cadena (ADN_{ds}) de la dilución 1/10. Para saber la concentración de partida se multiplicó este valor por 10 (factor de dilución).

Las bases púricas y pirimidínicas absorben a 260 nm, y las proteínas a 280 nm. Haciendo el cociente entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm (OD_{260}/OD_{280}), se obtiene un valor que refleja el estado de pureza del ADN. Si este valor está próximo a 1,8, el ADN obtenido se encuentra libre de contaminantes celulares y, por lo tanto, puede ser correctamente cuantificado por absorbancia a 260 nm, mediante la relación $1 OD_{260} \approx 50 \mu\text{g/ml}$ de ADN_{ds} .

III.3.3. Preparación de los estándares y las curvas de calibrado

Una vez conocidas las concentraciones de ADN de los treinta y tres extractos purificados de ADN ([apartado III.3.2.3](#)) se ajustaron todos a 5 ng/ μ l con agua milli-Q estéril. A partir de estas diluciones se mezclaron en tubos *Eppendorf* de 1,5 ml, y con la ayuda de un *vortex* (10-30 seg), los siguientes volúmenes...

- **Estándar de ADN de trigo:** 50 μ l de cada una de las veinticinco variedades de trigo (50 μ l x 25 = 1.250 μ l \equiv 1,25 ml).

- **Estándar de ADN de cebada:** 80 μl de cada una de las quince variedades de cebada (80 μl x 15 = 1.200 μl \equiv 1,20 ml).
- **Estándar de ADN de centeno:** 300 μl de cada una de las cuatro variedades de centeno (300 μl x 4 = 1.200 μl \equiv 1,20 ml).
- **Estándar de ADN de trigo/cebada/centeno:** 300 μl del estándar de ADN de trigo + 300 μl del estándar de ADN de cebada + 300 μl del estándar de ADN de centeno (300 μl x 3 = 900 μl \equiv 0,90 ml).

A partir de los cuatro estándares de ADN (5 ng/ μl) se hicieron alícuotas de 12 μl en tubos *Eppendorf* de 0,5 ml y se almacenaron a -20°C .

Las curvas de calibrado se obtuvieron a partir de diluciones seriadas de los estándares de ADN de trigo, cebada, centeno y trigo/cebada/centeno en agua milli-Q estéril (**Figura III.1**). La curva estándar de ADN de trigo se compone de seis puntos (1.000, 100, 10, 1, 0,2 y 0,1 pg por reacción). La de cebada (10.000, 1.000, 100, 10 y 1 pg por reacción) y las de centeno y trigo/cebada/centeno (10.000, 1.000, 100, 10 y 5 pg por reacción) de cinco puntos.

Arumuganathan & Earle (1991) estimaron los tamaños de los genomas haploides del trigo, la cebada y el centeno en 15.966, 4.873 y 8.110 Mpb, respectivamente (Arumuganathan & Earle, 1991). Las masas correspondientes (17,50, 5,34 y 8,89 pg) se calcularon con la fórmula $m = n \cdot (1.096 \cdot 10^{-3} \text{ pg} / \text{Mpb})$, donde m es la masa (en pg) y n el tamaño (en Mpb) de los genomas haploides (http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf). Con estos valores se determinaron las equivalencias entre picogramos de ADN y número de genomas haploides por reacción de los distintos puntos de las curvas de calibrado de los cuatro sistemas de Q-PCR (**Tabla III.2**).

Tabla III.2 Equivalencias entre picogramos de ADN por microlitro (pg ADN / μ l), picogramos de ADN por reacción (pg ADN / reacción), picogramos de ADN por miligramo de muestra (pg ADN / mg) y número de genomas haploides por reacción (n° genomas haploides / reacción) de los distintos puntos de las curvas de calibrado de los sistemas de Q-PCR individuales (trigo, cebada y centeno) y del simultáneo (TCC).

pg ADN / μ l	5.000	500	50	5	2,5	0,5	0,1	0,05	
pg ADN / reacción	10.000	1.000	100	10	5	1	0,2	0,1	
pg ADN / mg	1.000.000	100.000	10.000	1.000	500	100	20	10	
n° genomas haploides / reacción	Trigo	-	57	5,7	0,57	-	0,057	0,011	0,006
	Cebada	-	187	18,7	1,87	0,93	0,187	-	-
	Centeno	1.125	112	11,2	1,12	0,56	-	-	-
	TCC	1.190	119	11,9	1,19	0,59	-	-	-

En un estudio posterior se determinó la estabilidad de las diluciones de los estándares de ADN almacenadas a 4°C. Para ello, se hizo un seguimiento en el tiempo (durante un periodo de 50 días) de la cantidad de ADN presente en unas diluciones del estándar de ADN de trigo, que se conservaron durante todo ese tiempo a 4°C. Los resultados de este estudio de estabilidad se discuten en el [apartado IV.6.1.3.1](#).

III.4. PRIMERS Y SONDAS

Los *primers* y sondas utilizados en este trabajo se diseñaron con la ayuda del software *Primer Express™ v2.0* (Applied Biosystems). Se siguieron los criterios de la “*Líneas Universales de Diseño*”, desarrollados por el fabricante del equipo de Q-PCR (Applied Biosystems). El objetivo de estos criterios era conseguir las mismas condiciones de amplificación para cualquier secuencia de ADN (1 ciclo de 10 min a 95°C y n-ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C). De esta forma se facilitó la cuantificación de distintos genes en el mismo ensayo de Q-PCR. Dichos criterios fueron:

- Que el contenido de guanina-citosina del *primer* y/o la sonda estuviera dentro del intervalo 20-80% del total de bases.
- Que el contenido de guaninas de la sonda nunca fuera superior al contenido de citosinas.
- Que el extremo 5' de la sonda nunca terminase en guanina.
- Que en la sonda nunca hubiese más de tres guaninas continuas.

- Que en las últimas cinco bases del extremo 3' del *primer* nunca hubiese más de dos guaninas y/o citosinas.
- Que la longitud total del *primer* estuviera entre 18-40 pb y la de la sonda entre 18-30 pb.
- Que la temperatura teórica de desnaturalización del *primer* (Breslauer *et al.*, 1986) estuviera entre 58-60°C y la de la sonda entre 68-70°C.
- Que la diferencia entre las temperaturas teóricas de desnaturalización de los *primers* directo y reverso fuese igual o inferior a 2°C.
- Que ambos *primers* delimitaran un fragmento en la secuencia de ADN a amplificar cuya longitud se encontrase dentro del intervalo 50-100 pares de bases (pb).

Posteriormente se verificó que cada *primer* no formase fácilmente estructuras secundarias intramoleculares, ni hibridase fácilmente con otra molécula de *primer* idéntica, ni con el otro *primer* de la misma pareja. Para ello se utilizaron las herramientas informáticas *Primer Express*[™] v2.0 y *Net Primer* (PREMIER Biosoft Internacional: <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>).

Los *primers* fueron sintetizados por Sigma-Genosys Ltd. (Pampisford, UK). Se suministraron libres de sales, liofilizados y a -20°C. Se les dio un pequeño pulso en una centrífuga de tubos *Eppendorf* (10 seg, 13.200 rpm/16.000 g) y se resuspendieron en **tampón TE 1x** [Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM] siguiendo las instrucciones del fabricante, hasta una concentración final de 100 µM. Para facilitar el proceso se agitaron durante 1 min a 1.400 rpm. Por último, se hicieron alícuotas de 100 µl, que se conservaron a -70°C.

Las soluciones *stock* 10x se prepararon diluyendo la solución madre (100 µM) en tampón TE 1x. También se hicieron alícuotas de 100 µl, que se conservaron a -20°C.

III.5. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO-REAL (Q-PCR)

III.5.1. Reactivos

III.5.1.1. Sistemas basados en el fluoróforo SYBR[®] Green I

Para los sistemas basados en el fluoróforo SYBR[®] Green I, se utilizaron los reactivos “SYBR[®] Green PCR Core Reagents Kit” (Applied Biosystems). Cada reacción de Q-PCR contenía 2 µl de ADN molde (de los estándares o de las diluciones 1/5 y 1/10 en H₂O milli-Q estéril de los extractos de ADN de la muestra o de los controles) y 18 µl de **mezcla de reacción** (las concentraciones finales de cada componente se detallan en la Tabla III.3).

Tabla III.3 Concentraciones finales de cada componente de la mezcla de reacción en los sistemas de Q-PCR individuales (trigo, cebada y centeno) y en el simultáneo (TCC).

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final			
		Trigo	Cebada	Centeno	TCC
Tampón de reacción SYBR [®] Green	10x	1x	1x	1x	1x
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	5 mM
dNTPs mix (dATP, dCTP, dGTP y dUTP)	12,5 mM (dATP, dCTP y dGTP, 2,5 mM cada uno; dUTP, 5 mM)	1,25 mM	1,25 mM	1,25 mM	1,25 mM
Polimerasa AmpliTaq Gold [™]	5 U/µL	0,025 U/µL	0,025 U/µL	0,025 U/µL	0,025 U/µL
UNG AmpErasa [®]	1 U/ µL	0,01 U/µL	0,01 U/µL	0,01 U/µL	0,01 U/µL
Primer directo	10x	300 nM	50 nM	300 nM	300 nM
Primer reverso	10x	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM

En el caso de *n*-reacciones, para calcular el volumen necesario de cada reactivo, se diseñaron distintas hojas de cálculo (Microsoft[®] Excel 2002, Microsoft[®], USA). Para no quedarse sin mezcla de reacción mientras se hacían las alícuotas (debido a posibles errores en el pipeteo), la hoja de cálculo aumentaba en un 5% el volumen de mezcla de reacción necesario.

La afinidad de los *primers* por el ADN molde no siempre es la misma, por lo tanto hubo que averiguar qué concentración de cada uno de ellos era la más adecuada para obtener una mayor y mejor respuesta. Para ello se diseñó una **matriz de primers** para cada sistema de Q-PCR, combinando distintas concentraciones del *primer* directo (50, 150, 300 y 500 nM) con el *primer* reverso (50, 150, 300 y 500 nM). Los resultados de este estudio se discuten en el **apartado IV.2.2.**

III.5.1.2. Sistema de Q-PCR de trigo basado en sondas TaqMan®

Para el sistema de Q-PCR de trigo basado en sondas TaqMan® ([apartado Error! No se encuentra el origen de la referencia.](#)) se utilizó la “TaqMan® Universal PCR Master Mix” (Applied Biosystems), solución “ready-to-use” (“lista para usar”) que contiene todos los reactivos necesarios para la Q-PCR a una concentración 2x (ROX, MgCl₂, dNTPs, polimerasa AmpliTaq Gold™ y UNG AmpErasa®).

Cada reacción de Q-PCR contenía 2 µl de ADN molde (de los estándares o de las diluciones 1/5 y 1/10 en H₂O milli-Q estéril de los extractos de ADN de las muestra o de los controles) y 18 µl de **mezcla de reacción** (las concentraciones finales de cada componente se detallan en la [Tabla III.4](#)).

Tabla III.4 Concentraciones finales de cada componente de la mezcla de reacción del sistema de Q-PCR de trigo basado en sondas TaqMan®.

Reactivo (µL / reacción)	Concentración inicial	Concentración final
TaqMan® Universal PCR Master Mix (10 µL)	2x	1x
Sonda TM.1 (2 µL)	1,5 µM	150 nM
Primer directo W.F1 (2 µL)	3 µM	300 nM
Primer reverso W.R3 (2 µL)	3 µM	300 nM
Agua milli-Q estéril (2 µL)		

III.5.1.3. Desarrollo y optimización de un sistema “home-made” de reactivos de Q-PCR

Con el objetivo de abaratar costes, se intentó sustituir el “SYBR® Green PCR Core Reagents Kit” (Applied Biosystems) por un sistema “home-made” (casero) de reactivos de Q-PCR. Para ello, se estudió el efecto de distintos aditivos (glicerol, DMSO, BSA y Triton® X-100) sobre el sistema individual de Q-PCR de trigo. Las muestras empleadas en estos experimentos consistieron en diluciones seriadas del ADN purificado de la variedad de trigo duro *Aldeano*. Se utilizaron los mismos métodos de extracción, purificación y cuantificación de ADN que los empleados con las demás variedades del estándar de ADN de trigo ([apartado III.3](#)). Una vez optimizadas las concentraciones de los reactivos ([apartado IV.10](#)), se estableció el siguiente protocolo de amplificación:

Cada reacción de Q-PCR contenía 2 μL de ADN molde (ADN de trigo o controles) y 18 μL de **mezcla de reacción** (las concentraciones finales de cada componente de la mezcla de reacción se detallan en la [Tabla III.5](#)). El *buffer* de PCR, el MgCl_2 , la polimerasa AmpliTaq Gold™ y la UNG AmpErasa® eran de Applied Biosystems; los dNTPs, el DMSO (dimetilsulfóxido) y el Triton® X-100 (t-Octilfenoxipolietoxietanol) de Sigma-Aldrich; el Glicerol de Merck; el SYBR® Green I y la BSA Fracción V de Roche Diagnostics y el ROX (6-carboxi-tetrametilrodamina) de Fluka.

Tabla III.5 Concentraciones finales de cada componente de la mezcla de reacción del sistema “*home-made*” de reactivos de Q-PCR.

Reactivo (μL / reacción)	Concentración inicial	Concentración final
Solución tampón (8 μL):		
<i>Buffer</i> de PCR	2,5x	1x
MgCl_2	6,25 mM	2,5 mM
dNTPs mix (dATP, dCTP, dGTP y dUTP)	3,125 mM (dATP, dCTP y dGTP, 0,625 mM cada uno; dUTP, 1,25 mM)	1,25 mM (dATP, dCTP y dGTP, 0,25 mM cada uno; dUTP, 0,5 mM)
Glicerol	20%	8%
Solución de fluoróforos (1,2 μL):		
DMSO	100%	6%
SYBR® Green I	8,3x	0,5x
ROX	5.000 nM	300 nM
Solución de adyuvantes (0,2 μL):		
BSA Fracción V	1 mg/ml	0,01 mg/ml
Triton® X-100	10%	0,1%
Polimerasa AmpliTaq Gold™ (0,1 μL)	5 U/ μL	0,025 U/ μL
UNG AmpErasa® (0,2 μL)	1 U/ μL	0,01 U/ μL
Primer directo W.F1 (2 μL)	3 μM	300 nM
Primer reverso W.R1 (2 μL)	3 μM	300 nM
Agua milli-Q estéril (4,3 μL)		

III.5.2. Fungible

Las reacciones de Q-PCR se llevaron a cabo en placas de policarbonato/polipropileno de 96 pocillos (*Semi-skirted colorless twin.tec PCR plate 96, Eppendorf*). Una vez aplicados todos los puntos de la curva estándar, las muestras y los controles, se sellaron las placas con *films* adhesivos (Sigma-Aldrich) y se centrifugaron 2 min a 3.700 rpm/2.250 g en una centrífuga con adaptador de placas (*5804, Eppendorf*).

III.5.3. Condiciones de amplificación

Después de centrifugar la placa, se colocó sobre el bloque térmico del equipo de Q-PCR “ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System” (Applied Biosystems). Dependiendo del sistema de Q-PCR (trigo, cebada, centeno o trigo/cebada/centeno), se programó el equipo con el correspondiente protocolo de amplificación (**Tabla III.6**). Como se ha comentado en el **apartado III.4**, los *primers* y las sondas se diseñaron siguiendo los criterios de la “Líneas Universales de Diseño”. Estos criterios permitieron utilizar las mismas condiciones de amplificación para los cuatro sistemas de Q-PCR (1 ciclo de 10 min a 95°C y n-ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C), facilitando la cuantificación de distintas especies en el mismo ensayo de Q-PCR.

Tabla III.6 Programa de termociclado que se empleó en los sistemas de Q-PCR individuales (trigo, cebada y centeno) y en el simultáneo (TCC).

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos			
			Trigo	Cebada	Centeno	TCC
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1	1	1	1
Desnaturalización	95°C	15 seg	30	30	30	35
Hibridación	60°C	1 min				

Cuando la mezcla de reacción se calienta desde la temperatura de hibridación de los *primers* (60°C) hasta la temperatura de desnaturalización (95°C), se alcanza durante unos segundos los 72°C (temperatura óptima de la polimerasa *AmpliTaQ Gold™*). Este tiempo es suficiente como para que la enzima pueda efectuar la polimerización completa de pequeñas cadenas de ADN, como es el caso de los productos de amplificación de los sistemas de Q-PCR desarrollados en esta Tesis Doctoral, que tienen unas longitudes comprendidas entre las 50 y las 100 pares de bases. Esto permitió eliminar la etapa de elongación de los protocolos de amplificación, con el consecuente ahorro en tiempo (entre 22 y 45 min por carrera) y, por lo tanto, en eficacia.

El registro de la fluorescencia emitida por el SYBR[®] Green I se realizó al final de cada etapa de hibridación o *annealing*. Los resultados se analizaron con el software *ABI PRISM[®] 7000 SDS v1.1* (Applied Biosystems).

III.5.4. Controles

Con el objetivo de minimizar el riesgo de contaminaciones cruzadas a partir de productos de amplificación procedentes de reacciones anteriores, se adoptaron una serie de medidas de seguridad:

- Empleo de puntas para pipetas automáticas con filtro (Sorenson[™] BioScience Inc., Utah, USA).
- Uso del sistema enzimático **uracil-N-glicosilasa** (*AmpErase[®] UNG*) que consiste en la sustitución de dTTP por dUTP en la mezcla de los nucleótidos y en la adición de *AmpErase[®] UNG* a la mezcla de reacción. En esta reacción, la enzima ADN polimerasa incorpora uracilo en lugar de timina en la cadena de ADN de nueva síntesis. Las moléculas de ADN que contienen uracilo son el sustrato de la enzima *AmpErase[®] UNG* que cataliza la liberación de uracilo de la molécula y, en consecuencia, la degradación del fragmento de ADN. La mezcla de reacción, que contiene *AmpErase[®] UNG* (0,25 U / reacción), degrada las moléculas de ADN contaminantes de amplificaciones anteriores (con uracilo) que pudiera haber en la nueva mezcla de reacción, mientras que no degrada el ADN molde original, debido a que el uracilo no está presente en el ADN que se encuentra en la naturaleza (que contiene timina en vez de uracilo). Para ello se somete a la mezcla a una fase de descontaminación (incubación de 2 min a 50°C) previa a la fase de amplificación.

Para comprobar que no se han producido contaminaciones durante la extracción/amplificación, se han incluido dos tipos de controles negativos:

- (a) Como control negativo del proceso de **extracción** del ADN se utilizó una harina de maíz negativa por ELISA-R5 Sándwich (< 1,5 ppm de prolaminas). A los 18 µl de mezcla de reacción (apartado III.5.1) se añadieron 2 µl de una dilución 1/5 del extracto de ADN de esta harina (20 µl extracto + 80 µl H₂O milli-Q estéril).
- (b) En los controles negativos de la reacción de **amplificación** del ADN (*NTCs*) los 2 µl del extracto de ADN se sustituyeron por 2 µl de agua milli-Q estéril.

III.6. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

III.6.1. Curvas de disociación

Al terminar las reacciones de amplificación, se generaron las curvas de disociación (o curvas de *melting*), en las que se monitoriza la fluorescencia de los productos de amplificación en relación con el aumento de la temperatura: a medida que se incrementa la temperatura, la fluorescencia disminuye. En el caso del SYBR[®] Green I esto es debido a la separación de la doble cadena del ADN y, consecuentemente, a la liberación del fluorocromo. La curva de disociación permite determinar la *temperatura de melting* (T_m) característica del producto específico de amplificación y la existencia de otros productos inespecíficos (como, por ejemplo, *dímeros de primers*).

III.6.2. Electroforesis en geles de agarosa

III.6.2.1. Geles de agarosa teñidos con SYBR[®] Green I

La electroforesis en geles de agarosa también permite determinar la presencia o ausencia de *dímeros de primers*, así como verificar el tamaño del producto de amplificación (pb).

Dependiendo del tamaño del gel y del peine (Tabla III.7), se mezclaron 2-10 μ l de cada muestra (productos de amplificación de PCR) con 2 μ l de **tampón de carga Blue/Orange 1,5x** [Ficoll[®] 400 3,75%, xilen-cianol FF 7,5‰, azul de bromofenol 7,5‰, naranja G 0,1%; Promega]. El xilen-cianol FF migra con bandas de ADN de ~4 kb, el azul de bromofenol con bandas de ~300 pb y el naranja G con bandas de ~50 pb (para electroforesis en geles de agarosa al 0,5-1,4% en tampón TBE).

Tabla III.7 Cantidad de muestra aplicada por pocillo (μ l) en función del tamaño del gel y del peine utilizado.

Geles pequeños (7 cm x 10 cm)		Geles grandes (20 cm x 10 cm)	
Peine de 12 pocillos (1 mm x 4 mm)	Peine de 22 pocillos (1 mm x 5 mm)	Peine de 30 pocillos (1 mm x 3 mm)	
5-10 μ l	5-10 μ l	2-5 μ l	

Estos 4-12 μl se cargaron en geles horizontales de agarosa (Sigma-Aldrich) al 3% (w/v) con SYBR[®] Green I 1x (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en tampón TAE 1x [Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM (Panreac, Barcelona, España), EDTA 1 mM, pH ~8,4].

III.6.2.2. Condiciones electroforéticas

Las electroforesis de **geles de agarosa pequeños** (7 cm x 10 cm) se llevaron a cabo en una cubeta *Hoefer HE 33* (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) y las de **geles de agarosa grandes** (20 cm x 10 cm) en una cubeta *GNA-200* (Amersham Biosciences). Se empleó tampón TAE 1x como tampón de separación y se aplicó una diferencia de potencial eléctrico constante de 140 V a temperatura ambiente durante 30-90 min (hasta que el frente del naranja G, que migra con las bandas de ADN de ~50 pb, se encontraba aproximadamente a 2-3 cm del final del gel). Como fuente de alimentación se utilizó una *PowerPac 300* (Bio-Rad, California, USA).

III.6.2.3. Marcador de peso molecular

Como marcador de peso molecular se utilizó una *escalera de 25 pb* (Promega). Como se puede ver en la **Figura III.2**, este patrón contiene 12 fragmentos de ADN, con tamaños que van desde las 25 pb hasta las 300 pb, en incrementos exactos de 25 pb (es decir: 25, 50, 75, ... , 275 y 300 pb). Se mezclaron 10 μl de marcador (364 ng/ μl) con 20 μl de tampón de carga *Blue/Orange* 1,5x y 90 μl de tampón TAE 1x. Se hicieron alícuotas de 6 μl , que se conservaron a -20°C.

En los geles con bromuro de etidio / SYBR[®] Green I se aplicaron 6 μl /pocillo (una alícuota) del marcador de peso molecular diluido.

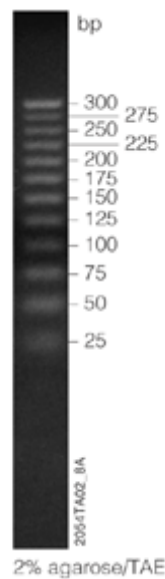


Figura III.2 Marcador de peso molecular de ADN utilizado en esta Tesis Doctoral (escala de 25 pb, de Promega Corporation).

III.6.2.4. Adquisición digital de imágenes

Las imágenes de los geles fueron hechas con el equipo de adquisición de imágenes digital *Fluor-S™ Multimager* (Bio-Rad) utilizando el software de análisis de imágenes *Quantity One®* v4.2.1 (Bio-Rad).

Para editar las imágenes (variar el brillo/contraste, añadir texto, recortar...) se utilizó el *Adobe® Photoshop® 5.0* (Adobe Systems Inc., San José/California, USA).

III.6.2.5. Estudio comparativo entre el bromuro de etidio y el SYBR® Green I

Se realizó un estudio comparativo entre la tinción de geles de agarosa con **Bromuro de Etidio** (intercalante) y **SYBR® Green I** (molécula capaz de unirse al surco menor del ADN) y de su efecto sobre la sensibilidad de detección de pequeñas cantidades de ADN.

Se hicieron diluciones seriadas 1/2 (en tampón TAE 1x) del producto de amplificación del sistema de Q-PCR de trigo obtenido al amplificar 1 pg del correspondiente estándar de ADN, dando lugar a los siguientes puntos: 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 fg. Se mezclaron 10 µl de cada punto con 2 µl de *tampón de carga Blue/Orange 1,5x*. Estos 12 µl se cargaron en dos geles pequeños de agarosa al 3% (w/v), uno teñido con bromuro de etidio 0,5 µg/ml (Promega) y el

otro con SYBR[®] Green I 1x, en tampón TAE 1x. Los marcadores de ADN se añadieron directamente a los geles de agarosa, antes de que se enfriasen y polimerizasen.

Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta *Hoefler HE 33*. Se empleó tampón TAE 1x como tampón de separación y se aplicó una diferencia de potencial eléctrico constante de 140 V a temperatura ambiente durante 30 min, utilizando una fuente de alimentación *PowerPac 300*.

III.7. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS DE DETECCIÓN/CUANTIFICACIÓN DE GLUTEN

III.7.1. Preparación del estándar de gliadinas

Como material certificado de referencia para calibrar los sistemas de *ELISA-R5 Sándwich* y *Western Blot R5* se utilizó el **Estándar Europeo de Gliadinas** (van Eckert *et al.*, 2006) cedido amablemente por el *Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (PWG)*, con un contenido estimado de proteínas del 86,4% (determinado por nitrógeno *Kjendahl*). De la concentración de 503 µg/ml del Estándar Europeo de Gliadinas (en etanol 60%) se hicieron alícuotas de 50 µl en tubos *Eppendorf* de 0,5 ml, que se conservaron a temperatura ambiente.

III.7.2. Extracción de prolaminas

III.7.2.1. Extracción con etanol 60%

- Se pesaron 125 mg de muestra homogenizada (**apartado III.2.1**), se depositaron en un tubo de propileno de 10 ml, se añadieron 5 ml de etanol 60% [300 ml de etanol (Scharlau, Barcelona, España) + 200 ml de agua milli-Q] y se agitaron unos segundos en el *vortex* (10-60 seg) hasta resuspender completamente las muestras.
- Estas mezclas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, en un agitador orbital a 45 rpm. Después se centrifugaron los tubos 10 min a 3.525 rpm/2.500 g (temperatura ambiente).
- Con pipetas *Pasteur* de vidrio, y evitando aspirar parte del precipitado, se transfirieron los sobrenadantes (extractos de prolaminas de las muestra) a tubos limpios de propileno de 10 ml.

- Para cuantificar el gluten de estos extractos mediante ELISA-R5 Sándwich se diluyeron en **tampón PBS-Tw** [Tween[®] 20 0,05% (v/v) (Sigma-Aldrich) en PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM; Merck)] según el grado de contaminación estimado de la muestra (Tabla III.8).

III.7.2.2. Extracción con “Cocktail Solution” (Garcia *et al.*, 2005)

- Se pesaron 125 mg de muestra homogenizada (apartado III.2.1) y se depositaron en un tubo de propileno de 10 ml. Se añadieron 1,25 ml de “*Cocktail Solution*” (patente WO 02/092633 A1). Para evitar evaporaciones, se cerraron los tubos con su correspondiente tapón y se sellaron con papel *Parafilm*. Se agitaron unos segundos con la ayuda de un *vortex* (5-10 seg) y se incubaron en una estufa a 50°C durante 40 min.
- Tras dejarse enfriar las muestras a temperatura ambiente, se añadieron 3,75 ml de etanol 80% [400 ml de etanol + 100 ml de agua milli-Q] y se agitaron unos segundos en el *vortex* (10-60 seg) hasta resuspender completamente las muestras.
- Estas mezclas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, en un agitador orbital a 45 rpm. Después se centrifugaron los tubos 10 min a 3.525 rpm/2.500 g (temperatura ambiente).
- Con pipetas *Pasteur* de vidrio, y evitando aspirar parte del precipitado, se transfirieron los sobrenadantes (extractos de prolaminas de las muestra) a tubos limpios de propileno de 10 ml.
- Para cuantificar el gluten de estos extractos mediante ELISA-R5 Sándwich se diluyeron en **tampón PBS-Tw** [Tween[®] 20 0,05% (v/v) (Sigma-Aldrich) en PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM; Merck)] según el grado de contaminación estimado de la muestra (Tabla III.8).

Tabla III.8 Diluciones recomendadas de los extractos de las muestras para ensayar por ELISA-R5 Sándwich, según el contenido estimado de gluten.

Gluten (ppm)	Dilución
< 50	1/25
	1/50
50-100	1/50
	1/100
100-150	1/100
	1/200
150-300	1/200
	1/400
300-600	1/400
	1/800
> 600	> 1/800

III.7.3. Anticuerpos

En el desarrollo de este trabajo se ha utilizado el **anticuerpo monoclonal R5** (Sorell *et al.*, 1998; Osman *et al.*, 2001; Henterich *et al.*, 2003; Valdes *et al.*, 2003; Mendez *et al.*, 2005), sin conjugar y conjugado con peroxidasa de rábano (R5-HRP).

III.7.4. Cuantificación de gluten mediante ELISA-R5 Sándwich (Valdes *et al.*, 2003)

- Se recubrió una placa de poliestireno EIA/RIA de 96 pocillos (COSTAR® 3590, Corning, NY, USA) con 100 µl/pocillo de **solución de recubrimiento** (AcM R5 3 µg/ml en tampón carbonato/bicarbonato sódico 50 mM pH 9,6) y se incubó la placa en una cámara húmeda a 4°C durante toda la noche (*overnight*).
- Se lavó la placa 3 veces en un lavador *ImmunoWash Model 1575* (Bio-Rad) con 300 µl/pocillo de tampón PBS-Tw. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con 300 µl/pocillo de **solución de bloqueo** [BSA Fracción V 1% (Roche Diagnostics) en tampón PBS-Tw] durante 1 h a 37°C en cámara húmeda.
- Se lavó la placa 3 veces con 300 µl/pocillo de tampón PBS-Tw. Entonces se añadieron 100 µl/pocillo de los puntos de la **curva estándar de gliadinas** (desde 100 ng/ml hasta 0,78

ng/ml, obtenidos mediante diluciones seriadas 1/2 en tampón PBS-Tw), de los extractos de prolaminas de las muestras (apartado III.7.2) y de los controles. Como **control positivo** se utilizó la concentración de 0,312 µg/ml del Estándar Europeo de Gliadinas (en etanol 60%), equivalente a 5 mg gluten/100 g alimento (50 ppm). Como **control de fondo** (blanco) se utilizó tampón PBS-Tw. Los valores de absorbancia correspondientes al blanco debían ser inferiores a 0,200 unidades.

- Se dejó reposar la placa durante 1 h a 37°C en cámara húmeda y luego se hicieron 3 lavados con 300 µl/pocillo de tampón PBS-Tw. El siguiente paso fue añadir 100 µl/pocillo de AcM R5 conjugado con peroxidasa de rábano (R5-HRP, dilución 1:20.000 en tampón PBS-Tw) y se volvió a incubar la placa otra hora en cámara húmeda, pero esta vez a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Se hicieron otros 6 lavados con 300 µl/pocillo de tampón PBS-Tw. La reacción colorimétrica tuvo lugar añadiendo 100 µl/pocillo de sustrato *Enhanced K-Blue[®] TMB* (Neogen, Lexington, Kentucky, USA). Se incubó la placa 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Se paró la reacción adicionando 50 µl/pocillo de **solución de parada** [ácido sulfúrico 2,5 M (Fluka)] y se leyeron las absorbancias a 450 nm en un lector de placas *MICROPLATE READER Model 550* (Bio-Rad).

III.7.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y Western Blot R5 (Valdes *et al.*, 2003)

- Se pusieron 500 µl de la solución de prolaminas extraídas con etanol 60% (apartado III.7.2.1) en un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml y se secaron en un evaporador-calentador rotatorio a vacío *UNIVAPO 100 H* (UniEquip). Cuando las muestras estuvieron completamente secas (~30-40 min) se añadió al *pellet* 50 µl de **tampón de ruptura 1x** [Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glicerol 10% (Merck), SDS 2%, azul de bromofenol 0,1% (Sigma-Aldrich), β-mercaptoetanol 5% (Sigma-Aldrich)]. Se agitaron unos segundos con la ayuda de un *vortex* (10-30 seg) hasta resuspender completamente las muestras. Entonces se calentaron 5 min a 100°C en un bloque térmico *Thermomixer comfort* con agitación (1.400 rpm). Se les dio un pequeño pulso en una centrífuga de tubos *Eppendorf* (10 seg, 13.200 rpm/16.000 g) y se cargaron 20 µl de cada muestra en los pocillos del **gel empaquetador** [Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%, acrilamida (Serva) / bisacrilamida (Bio-Rad) 5%, persulfato amónico 0,75 ‰, TEMED 0,1% (Bio-Rad)].

- Las prolaminas se resolvieron a 25 mA constantes, con un voltaje inicial de ~100 V y un voltaje final de ~230 V, durante aproximadamente 1 h 30 min, en un **gel separador** [Tris-HCl 812 mM pH 8,9, SDS 0,1%, acrilamida/bisacrilamida 18%, persulfato amónico 0,60‰, TEMED 0,1%]. Las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente en una cubeta *Mini-PROTEAN® 3 Cell* (Bio-Rad) con **tampón de electroforesis** [Tris 25 mM, glicina 192 mM (Merck), SDS 0,1%, pH 8,3] utilizando una fuente de alimentación *PowerPac 300*.
- Una vez acabada la electroforesis se incubó el gel de SDS-PAGE en **tampón de transferencia** [CAPS-NaOH 10 mM (Sigma-Aldrich; Merck) pH 11,0, metanol 10% (v/v) (Panreac)] durante 15 min a temperatura ambiente y con agitación suave. Mientras tanto, se cortó la membrana de nitrocelulosa *PVDF Immobilon™-P 0.45 μm* (Millipore, Bedford, USA) del tamaño del gel (10 cm x 8 cm), se sumergió en metanol puro durante 1 min, se aclaró con agua milli-Q y se equilibró en tampón de transferencia 10-15 min a temperatura ambiente y con agitación suave.
- En una bandeja grande con tampón de transferencia se sumergió la “sandwichera” abierta del equipo de transferencia de proteínas *TE 22 Mighty Small™ Transphor Tank Transfer Unit* (Hoefer/Amersham Biosciences). Sobre el ánodo, y siguiendo el esquema de la **Figura III.3**, se dispusieron una almohadilla y dos capas de papel *Whatman 3MM* (11cm x 9 cm) mojadas en tampón de transferencia y encima la membrana de nitrocelulosa. Sobre ésta se situó el gel de SDS-PAGE y después se colocaron otras dos capas de papel *Whatman* y otra almohadilla (también empapadas en tampón de transferencia). La transferencia de las prolaminas se hizo en frío (4°C) a 400 mA constantes durante 2 h, utilizando una fuente de alimentación *PowerPac 3000* (Bio-Rad). Una vez acabada la transferencia, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa con 50 ml de solución de bloqueo [leche desnatada 5% (Central Lechera Asturiana) y BSA Fracción V 1% en tampón PBS-Tw] durante toda la noche (*overnight*) a 4°C.
- Al día siguiente se lavó la membrana de nitrocelulosa 3 veces, 5 min cada vez, en 50 ml de **solución de lavado** (tampón PBS-Tw) con agitación suave y a temperatura ambiente. Después se incubó con 20 ml del anticuerpo monoclonal R5 conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP-R5), diluido 1:5.000 en solución de lavado (4 μl HRP-R5 + 20 ml tampón PBS-Tw) durante 1 h, en oscuridad, con agitación suave y a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo se retiró con 6 lavados de 50 ml de solución de lavado, durante 30 min (5 min por lavado), en oscuridad, con agitación suave y a temperatura ambiente. La membrana se

reveló utilizando el *ECL Western Blotting Detection Reagent* (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

- Las imágenes de los membranas fueron hechas con el equipo de adquisición de imágenes digital *Fluor-S™ Multimager* utilizando el software de análisis de imágenes *Quantity One® v4.2.1*. Para editar las imágenes (variar el brillo/contraste, añadir texto, recortar...) se utilizó el *Adobe® Photoshop® 5.0*.

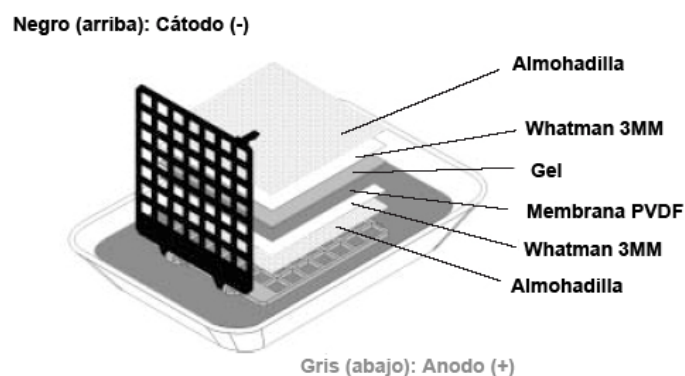


Figura III.3 Disposición de los elementos en el equipo de transferencia de proteínas *TE 22 Mighty Small™ Transphor Tank Transfer Unit* (Hoefer/Amersham Biosciences).

III.7.6. Análisis de alimentos “sin-gluten” mediante Espectrometría de Masas MALDI-TOF (Hernando *et al.*, 2003)

III.7.6.1. Tratamiento ácido de las prolaminas del maíz y del arroz

En un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml se pusieron 500 µl de la solución de prolaminas extraídas con etanol 60% ([apartado III.7.2.1](#)) y se secaron en un evaporador-calentador rotatorio a vacío *UNIVAPO 100 H* (UniEquip). Cuando las muestras estuvieron completamente secas (~40-60 min) se añadió al *pellet* 500 µl de ácido acético glacial 1 M y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en un bloque térmico *Thermomixer comfort* con agitación (1.400 rpm). A continuación se centrifugaron los tubos 5 min a 5.200 rpm / 2.500 g (temperatura ambiente). Con

una pipeta automática p200, y evitando aspirar parte del precipitado, se transfirieron los sobrenadantes (“SUPER”) a nuevos tubos Eppendorf de 0,5 ml y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su posterior análisis por Espectrometría de Masas MALDI-TOF.

III.7.6.2. Preparación de la muestras para su análisis por Espectrometría de Masas MALDI-TOF

- En un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml se pusieron 100 μ l de la solución de prolaminas extraídas con etanol 60% ([apartado III.7.2.1](#)) o, en el caso de alimentos basados en maíz o arroz, 100 μ l del sobrenadante (“SUPER”) del tratamiento ácido ([apartado III.7.6.1](#)). A continuación se añadieron 25 μ l de **matriz** [disolución saturada de ácido sinapínico (Fluka) en acetonitrilo/agua al 30% v/v (Merck), conteniendo ácido trifluoroacético al 0,1% (Merck)] y 8 μ l de detergente octil- β -D-1-tioglucopiranosido (ODGP) 50 mM (Fluka). Se agitaron unos segundos con la ayuda de un *vortex* (10-30 seg) y se secaron en un evaporador-calentador rotatorio a vacío *UNIVAPO 100 H* (UniEquip). Cuando las muestras estuvieron completamente secas (~30-40 min) se añadió al *pellet* 6 μ l de etanol/agua al 60% v/v, conteniendo ácido trifluoroacético al 0,1%. Se agitaron unos segundos con la ayuda de un *vortex* (10-30 seg), se les dio un pequeño pulso en una centrifuga de tubos *Eppendorf* (10 seg, 13.200 rpm/16.000 g) y a continuación se colocaron 1 μ l de cada muestra en los diferentes pocillos del *portamuestras* del equipo de masas MALDI-TOF (Voyager DE-PRO, Applied Biosystems), donde se dejaron secar durante 5 min.
- Los resultados se obtuvieron en modo lineal positivo, a 25 kV de voltaje de aceleración, con un “grid voltage” del 93%, un “guide wire” del 0,25% y un “delay time” de 700 ns. Se acumularon 100 disparos por adquisición y se sumaron tres o cuatro adquisiciones. La calibración externa se llevó a cabo con proteína A recombinante de *E. coli* (44.653 Da) y su doble carga (22.326 Da).

Capítulo IV. Resultados y Discusión

IV.1. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA CUANTITATIVO DE EXTRACCIÓN DE ADN EN ALIMENTOS

El proceso de detección/cuantificación de ADN mediante PCR cuantitativa en tiempo-real (Q-PCR) se divide en tres etapas:

- (a) Extracción/purificación del ADN (pre-PCR).
- (b) Reacción de PCR propiamente dicha.
- (c) Detección del producto de amplificación y análisis de los resultados (post-PCR).

El proceso de extracción/purificación del ADN (pre-PCR) es un factor de la mayor importancia en el análisis por Q-PCR. Para que los resultados sean *cuantitativos* y *reproducibles*, el método de extracción debe proporcionar un rendimiento lo más cercano posible al 100% y un ADN de la calidad suficiente para no inhibir la posterior reacción de PCR. Existen especies químicas que pueden limitar la posibilidad de amplificación de los ácidos nucleicos y pueden aparecer como contaminantes en el extracto de ADN. Estos inhibidores provienen de la muestra de partida o de los reactivos utilizados en el proceso de extracción y/o purificación de ADN y pueden actuar de muy distinta forma, ya sea interfiriendo con la lisis celular, capturando o degradando los ácidos nucleicos (Lindahl, 1993) o bien inhibiendo la actividad de la ADN polimerasa durante la reacción de amplificación (Demeke & Adams, 1992; Wilson, 1997; Abu Al-Soud & Radstrom, 1998; Kim *et al.*, 2000). Muchos alimentos contienen un número elevado de estos inhibidores de la reacción, como por ejemplo los polisacáridos o los polifenoles (taninos), que son difíciles de separar del ADN (Meyer, 1999).

IV.1.1. Estudio del método del CTAB (purificación con columnas)

En una primera fase de nuestro estudio, el ADN se extraía por el método del CTAB, que incluye una fase/etapa de purificación mediante precipitación con isopropanol ([apartado III.2.2.2](#)). En la [Figura IV.1](#) se muestran los rendimientos y la pureza de los extractos de ADN de seis harinas de trigo (*Triticum durum*, variedades Aldeano, Jabato y Araldun; *Triticum aestivum*, variedades Apuesto, Almonte y Amon). Con el método del CTAB se obtuvieron unos ADNs bastante limpios, con valores de pureza (determinada por el cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm) próximos a 1,6.

Al purificar estos extractos con las columnas *Wizard® Plus Minipreps* (que utilizan resinas que presentan afinidad por los ácidos nucleicos) se mejoró mucho la pureza de los extractos de ADN (valores de OD_{260}/OD_{280} más altos, entre 1,9 y 2,0). Sin embargo, durante este proceso de purificación se perdió mucha cantidad de ADN, dando lugar a unos rendimientos muy bajos, inferiores al 15% (**Figura IV.1**).

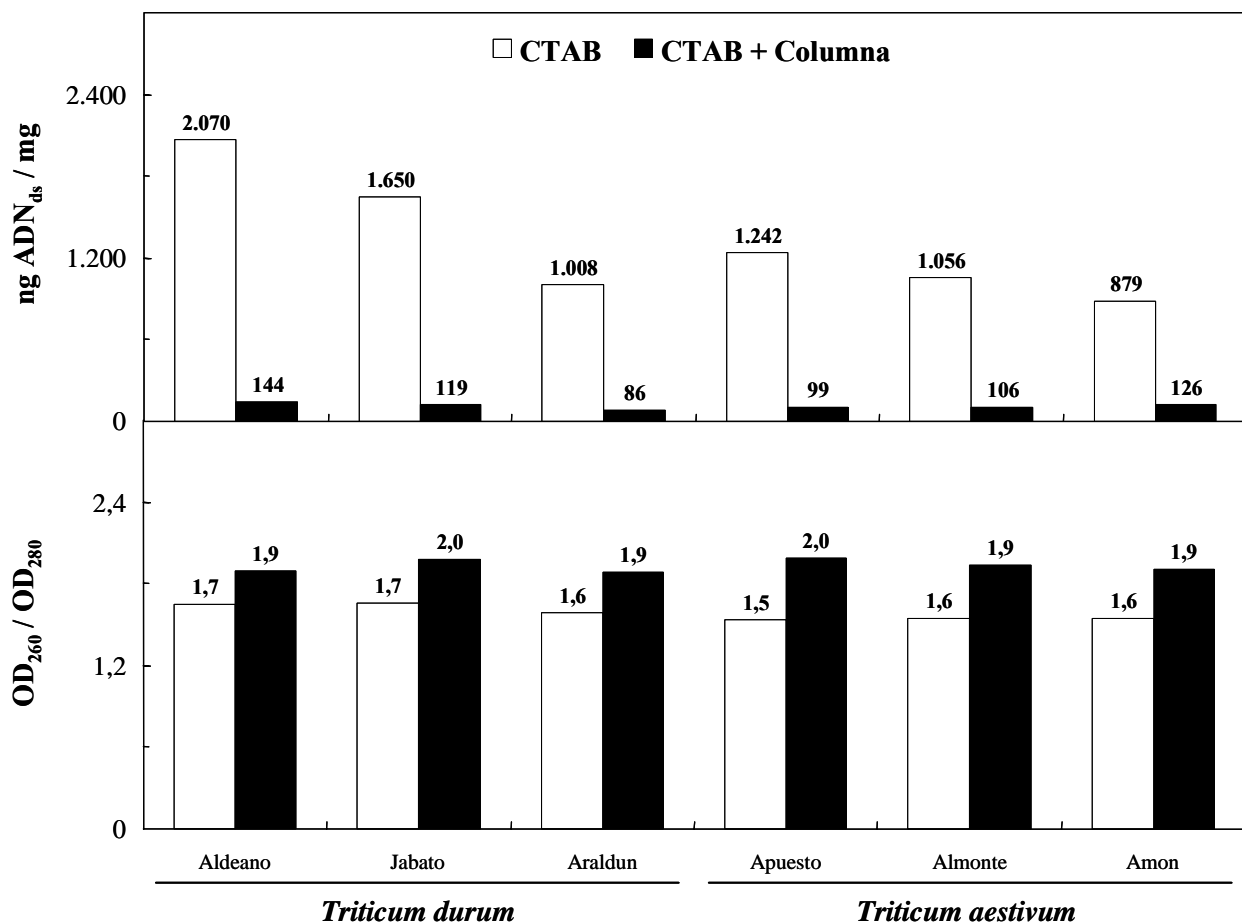


Figura IV.1 Concentración (ng ADN_{ds} / mg) y grado de pureza (OD_{260} / OD_{280}) de los extractos de ADN obtenidos con el método del CTAB a partir de seis variedades de trigo, antes y después de ser purificados con columnas *Wizard®*. Tanto la concentración como el grado de pureza de los extractos de ADN se determinaron por absorbancia (*Molecular Cloning*, 1989).

Zimmermann y colaboradores (1998) observaron algo similar con éste y otros sistemas de purificación, basados en la precipitación del ADN con etanol, isopropanol, acetato sódico... (**Tabla IV.1**). En este estudio se compararon el rendimiento, la calidad o pureza de los extractos, y la duración y coste de distintos métodos de extracción de ácidos nucleicos: cuatro con fase o etapa de purificación (*Wizard*, *DNeasy*, *Nucleon Phytopure* y *CTAB*) y tres sin ella (*ROSE*, *NaOH* y *Chelex 100*). Como se indica en la **Tabla IV.1**, la fase/etapa de purificación disminuye

enormemente el rendimiento global del proceso de extracción, pero se obtienen unos extractos de mucha mayor pureza. Además, estos métodos son más costosos, tanto en tiempo como en dinero. Por otra parte, los métodos basados simplemente en la lisis celular y en la extracción de los ácidos nucleicos (sin purificación) son mucho más rápidos, sencillos y baratos, y extraen más cantidad de ADN, aunque de peor calidad.

Tabla IV.1 Características de distintos métodos de extracción de ácidos nucleicos, con etapa/fase de purificación (*Wizard*, *DNeasy*, *Nucleon Phytopure* y *CTAB*) o sin ella (*ROSE*, *NaOH* y *Chelex 100*).

	Purificación	Rendimiento	Calidad/Pureza	Duración (min)	Coste relativo
<i>Wizard (Promega)</i>	Resina de afinidad	+	+++	230	35,1
<i>DNeasy (Qiagen)</i>	Resina de afinidad	+	+++	220	50,8
<i>Nucleon Phytopure (Scotlab Biosciences)</i>	Precipitación con isopropanol	+	+++	65	33,4
<i>CTAB</i>	Precipitación con isopropanol	+	++	90	2,0
<i>ROSE</i>	–	++	+++	30	1,1
<i>NaOH</i>	–	+++	+	5	1,0
<i>Chelex 100</i>	–	+++	+	210	12,7

Tabla elaborada a partir de los datos publicados por Zimmerman y colaboradores (1998)

IV.1.2. Estudio comparativo de 3 métodos de extracción de ADN

Teniendo en mente los resultados obtenidos en el estudio anterior, nuestro siguiente objetivo fue desarrollar un sistema de extracción de ADN (1) *rápido*, (2) *eficiente* (recuperación próxima al 100%) y (3) que proporcionase un ADN de la *calidad* suficiente como para poder ser utilizado directamente en la reacción de Q-PCR, sin necesidad de llevar a cabo un paso posterior de purificación. Para ello se analizaron los rendimientos de tres métodos distintos de extracción de ácidos nucleicos (como se describe en el [apartado III.2.2](#)):

- (a) **PrepMan™ Ultra**, reactivo de la casa comercial *Applied Biosystems*, como método rápido y sencillo de extracción de ADN.
- (b) **CTAB**, protocolo ampliamente utilizado en la extracción y purificación de ADN de muestras vegetales, como alternativa económica a los *kits* comerciales.
- (c) **Wizard®** como método oficial de extracción de ADN (*Swiss Food Manual*, Métodos de biología molecular, Capítulo 52B).

En el método (a) se siguieron las instrucciones del fabricante, mientras que en los métodos (b) y (c) se eliminó la fase/etapa de purificación (precipitación con isopropanol y columnas *Wizard*[®], respectivamente). Al no purificarse los extractos, no se pudo cuantificar el ADN total espectrofotométricamente, ya que la *suciedad* (principalmente proteínas) interferiría en la lectura de ODs a 260 nm.

Así que se decidió determinar los rendimientos de estos tres protocolos de extracción de ácidos nucleicos a partir de una harina de trigo duro (*Triticum durum*, variedad Aldeano), cuantificando la concentración de ADN de los extractos obtenidos con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo, como se describe en el **apartado IV.6.1**. De esta forma, quedaba reflejado en un mismo análisis (1) el rendimiento intrínseco del proceso de extracción y (2) la inhibición provocada por los componentes de la matriz de la harina. Si durante el proceso de extracción de los ácidos nucleicos hubieran quedado en el extracto sustancias inhibitorias, éstas afectarían a la posterior cuantificación del ADN con el sistema de Q-PCR de trigo, obteniéndose unos rendimientos de extracción mucho más bajos.

Como muestran los resultados de este estudio comparativo (**Figura IV.2.A**), fue el método *Wizard*[®] sin fase de purificación el que proporcionó los mayores rendimientos de extracción con el menor efecto inhibitorio de los extractos obtenidos sobre la reacción de amplificación. En principio, al eliminar la fase/etapa de purificación, se deberían obtener unos rendimientos de extracción más altos. Sin embargo, el método del CTAB sin fase/etapa de purificación proporcionó un rendimiento de extracción (800 ng ADN / mg, **Figura IV.2.A**) muy inferior al obtenido con el mismo método pero precipitando los ácidos nucleicos con isopropanol (2.070 ng ADN / mg, **Figura IV.1**). Que el rendimiento de extracción del método con fase de purificación sea mayor, indica la presencia de inhibidores en el extracto sin purificar. Probablemente sea el reactivo CTAB el causante de esta inhibición (Zimmermann *et al.*, 1998b). Al purificar los extractos mediante precipitación con isopropanol se elimina del medio el inhibidor, aumentando *en apariencia* el rendimiento de la extracción.

IV.1.3. Optimización de las condiciones de extracción del método *Wizard*[®] sin fase de purificación

A consecuencia de los resultados obtenidos en los análisis anteriores, se decidió efectuar una serie de modificaciones sobre el método *Wizard*[®] sin fase de purificación (**apartado III.2.2.3**) con la finalidad de desarrollar un nuevo método de extracción de ácidos nucleicos más eficiente y rápido que el original. Para ello se estudió el efecto de diferentes variables (el tiempo y la

temperatura de incubación, el volumen y la composición de los reactivos de extracción, y la cantidad de muestra) sobre el rendimiento de extracción. Las muestras empleadas en estos experimentos consistieron en la harina de una variedad de trigo duro (*Triticum durum*, variedad Aldeano) y muestras de alimentos contaminados con trigo. El ADN de estos extractos se cuantificó con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo, como se describe en el [apartado IV.6.1](#).

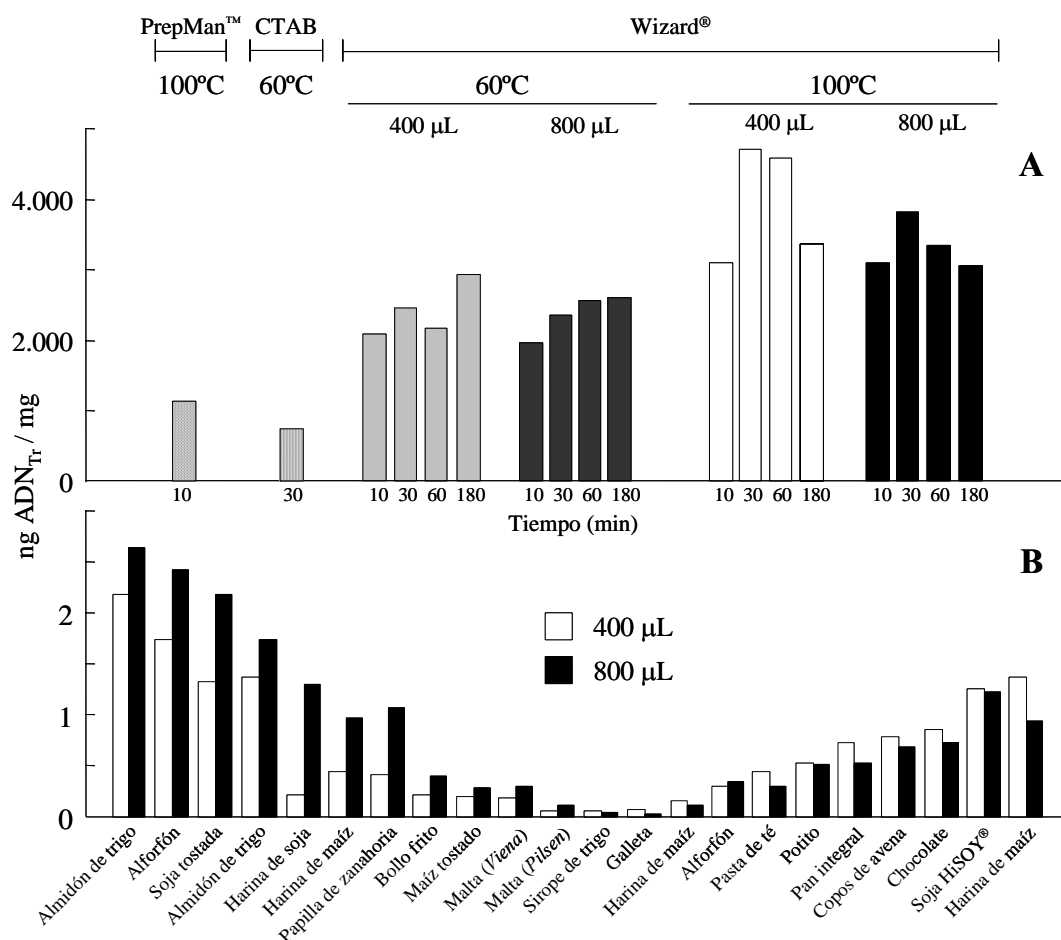


Figura IV.2 (A) Comparación de los rendimientos de extracción de ácidos nucleicos de los métodos *PrepMan™ Ultra*, CTAB y *Wizard®* sin fase de purificación, obtenidos a partir de una harina de trigo duro (*Triticum durum*, variedad Aldeano). Se probaron distintos tiempos (10, 30, 60 y 180 min) y temperaturas (60 y 100°C) de incubación, y distintos volúmenes de reactivos de extracción (400 y 800 µL en 20 mg de muestra). **(B)** Estudio del efecto del volumen de los reactivos de extracción (400 y 800 µL en 20 mg de muestra) sobre el rendimiento del método *Wizard®* sin fase de purificación (30 minutos a 100°C) en alimentos contaminados con trigo. Los valores están expresados en ng ADN_{Tr} / mg y fueron determinados con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo.

IV.1.3.1. Optimización del tiempo y la temperatura de incubación

La **Figura IV.2.A** muestra el efecto del tiempo y la temperatura de incubación sobre rendimiento de extracción de ácidos nucleicos del método *Wizard*[®] sin fase de purificación, a partir de una harina de trigo duro (*Triticum durum*, variedad Aldeano). Calentando la muestra a 60°C (según el protocolo original), se observó un incremento del rendimiento a medida que se aumentaba el tiempo de incubación (**Figura IV.2.A**). A esta temperatura no se encontraron diferencias sustanciales entre extraer la muestra (20 mg de harina) con 400 o con 800 µl de reactivos de extracción (**Figura IV.2.A**).

También se estudió el efecto de la temperatura de incubación sobre el rendimiento de extracción. Como se puede observar en la **Figura IV.2.A**, al aumentar la temperatura de incubación de 60 a 100°C, se aumentó el rendimiento de extracción (tanto con 400 como con 800 µl de reactivos). Sin embargo, a esta temperatura (100°C) se obtuvo el máximo rendimiento de extracción con un tiempo de incubación de 30 min. Si se calentaba la muestra durante más tiempo (60 y 180 min) el rendimiento de extracción descendía progresivamente (**Figura IV.2.A**). Estos resultados sirvieron para establecer 30 min a 100°C como las condiciones de incubación óptimas.

Simplemente eliminando la fase/etapa de purificación con columnas y aumentando la temperatura de incubación 60 a 100°C se ha logrado acortar el tiempo de incubación y aumentar el rendimiento de extracción del método *Wizard*[®] original (Koppel *et al.*, 1998).

IV.1.3.2. Optimización del volumen de los reactivos de extracción

En el caso de la harina de trigo duro, y en las condiciones óptimas de incubación (30 min a 100°C), el rendimiento era mayor si se extraía la muestra con 400 µl de reactivos de extracción en lugar de 800 µl (**Figura IV.2.A**). Para comprobar que esta observación no era un caso aislado, se estudió el efecto del volumen de los reactivos de extracción (400 y 800 µl en 20 mg de muestra) sobre el rendimiento de extracción en muestras de alimentos contaminados con trigo, empleando las condiciones óptimas de incubación (30 min a 100°C).

Como se puede observar en la **Figura IV.2.B**, en 11 de los 22 alimentos analizados, los rendimientos de las muestras extraídas con 800 µl de reactivos de extracción fueron notoriamente más altos que los obtenidos con 400 µl. Con los otros 11 alimentos sucedió todo lo contrario: los mayores rendimientos de extracción se obtuvieron con el volumen de 400 µl de reactivos. Sin embargo, en este último caso, las diferencias de rendimientos con respecto al

volumen de 800 μ l no fueron tan marcadas (**Figura IV.2.B**). Conforme a los resultados obtenidos, se decidió emplear 800 μ l de reactivos de extracción en los posteriores ensayos de optimización.

IV.1.3.3. Optimización de la cantidad de muestra

También se estudió el efecto de la cantidad de muestra sobre el rendimiento de extracción. Para ello se utilizaron cinco muestras de alimentos contaminados con trigo: un alforfón, una harina de soja tostada, una papilla de zanahoria, un potito de arroz y una soja *HiSOY*[®] (**Figura IV.3**). Se pesaron distintas cantidades de muestra (10, 20 y 40 mg), se añadieron 800 μ l de reactivos de extracción y se calentaron las mezclas a 100°C durante 10 ó 30 min.

Como era de esperar, conforme disminuye la cantidad de muestra, aumenta el rendimiento de extracción (expresado en pg ADN_{Tr} / mg) (**Figura IV.3**). Este aumento es más pronunciado en las extracciones realizadas en las condiciones óptimas de incubación (30 min a 100°C). Sin embargo, 10 mg era una cantidad demasiado pequeña como para ser considerada parte representativa de la muestra o para ser pesada con fiabilidad. Así que se decidió utilizar una cantidad mayor (20 mg).

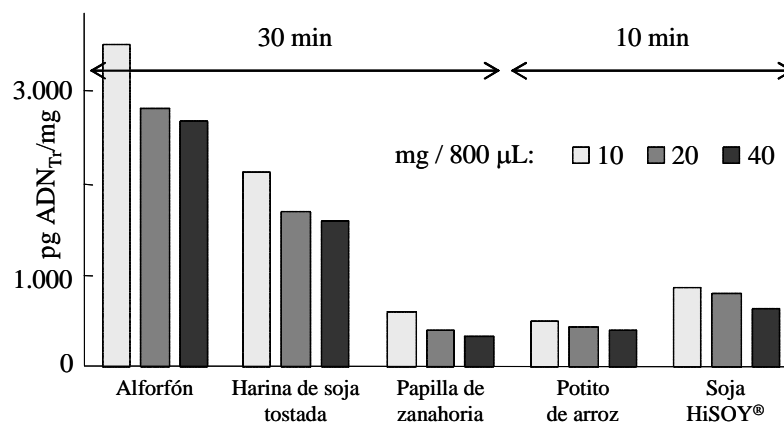


Figura IV.3 Efecto de la cantidad de muestra (10, 20 y 40 mg en 800 μ L de reactivos de extracción) sobre el rendimiento del método *Wizard*[®] sin fase de purificación (10 ó 30 minutos a 100°C) en muestras de alimentos contaminados con trigo. Los valores están expresados en pg ADN_{Tr} / mg y fueron determinados con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo.

IV.1.3.4. Optimización de los reactivos de extracción

En esta fase de nuestro estudio, se decidió optimizar las concentraciones de determinados componentes de los reactivos de extracción, con el principal objetivo de aumentar la eficiencia del método *Wizard*[®] sin fase de purificación, en las condiciones óptimas de extracción (20 mg de muestra en 800 µL de reactivos de extracción, calentados durante 30 minutos a 100°C).

El TRIS actúa como regulador del pH, manteniéndolo en 8,0. El EDTA actúa acomplejando cationes divalentes, como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , de modo que la presencia de EDTA en el tampón TNE protege al ADN de la acción de las *nucleasas* (enzimas que degradan el ADN y que utilizan estos iones como cofactores). El NaCl aporta fuerza iónica al medio. El SDS (detergente aniónico), la proteínasa K (enzima que degrada proteínas) y el clorhidrato de guanidina (agente caotrópico) son capaces de lisar las células y solubilizar las proteínas, liberando al medio los ácidos nucleicos.

IV.1.3.4.1. Composición del tampón TNE

En el tampón de extracción TNE (TRIS, NaCl, EDTA) el SDS está al 1% (w/v). Se decidió estudiar el efecto del aumento de la concentración de SDS (1-4%) sobre el rendimiento de extracción. Para ello se utilizó la misma harina de trigo duro analizada en los ensayos de optimización del tiempo y la temperatura de incubación (*Triticum durum*, variedad Aldeano). En dichos ensayos no se observaron diferencias sustanciales en el rendimiento (datos no mostrados) y, por lo tanto, se siguió utilizando la concentración del protocolo original (1%).

El *β -mercaptoetanol* es un agente reductor capaz de romper los puentes disulfuro de las proteínas. Junto con el clorhidrato de guanidina, es uno de los principios activos del “*Cocktail Solution*” ([apartado 1.2.1](#)). Dado que su utilidad está demostrada en la extracción de prolaminas en alimentos tratados con calor, se decidió estudiar su efecto sobre el rendimiento en la extracción de ácidos nucleicos del método *Wizard*[®] sin fase de purificación. Sin embargo, con la adición de este agente reductor al tampón TNE tampoco se mejoró el rendimiento de extracción (datos no mostrados).

IV.1.3.4.2. Concentración de proteinasa K

En las condiciones óptimas de extracción (20 mg de muestra en 800 μ L de reactivos de extracción, calentados durante 30 minutos a 100°C) cabría esperar que la enzima proteinasa K acabase desnaturalizada por el calor. Sin embargo, como se puede observar en la [Figura IV.4.A](#), su uso aumentó el rendimiento de extracción en cuatro de los cinco alimentos analizados, entre 1,6 y 3,3 veces.

Sabiendo que la proteinasa K era necesaria, se decidió optimizar su concentración, con el objetivo de abaratar el proceso de extracción de ácidos nucleicos. Se estudió el efecto de distintas concentraciones de proteinasa K en la mezcla de reactivos de extracción (0,4-0,8 mg/mL) sobre el rendimiento del proceso. Para ello se utilizaron cuatro muestras de alimentos contaminados con trigo: un potito de arroz, una soja *HiSOY*[®], una harina de maíz y unos copos de avena.

Como se puede observar en la [Figura IV.4.B](#) conforme aumenta la concentración de proteinasa K, el rendimiento de extracción aumenta (potito de arroz y copos de avena) o permanece constante (soja *HiSOY*[®] y harina de maíz).

Con los resultados obtenidos quedó demostrada la utilidad de la proteinasa K en el protocolo de extracción *Wizard*[®] sin fase de purificación. Aunque se intentó bajar la concentración de esta enzima, que representa el mayor gasto del proceso de extracción, el aumento del rendimiento en ciertas muestras de alimentos nos obligó a seguir usando la concentración del protocolo original (0,8 mg de enzima por ml de reactivos de extracción).

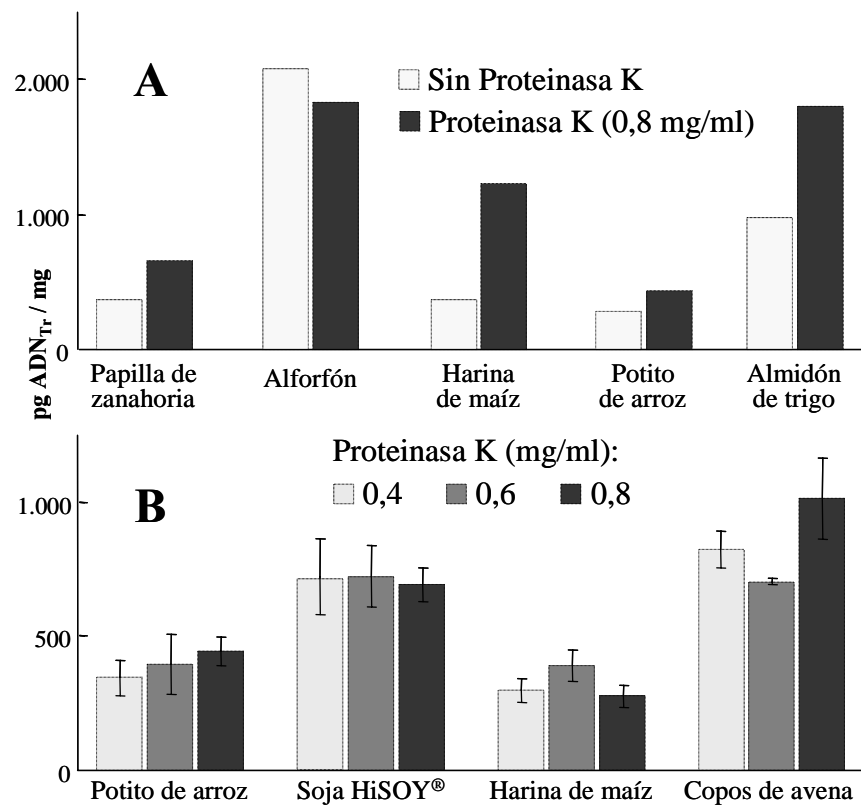


Figura IV.4 Efecto de la concentración final de proteinasa K (0, 0,4, 0,6 y 0,8 mg/ml) sobre el rendimiento del método *Wizard*® sin fase de purificación y en las condiciones óptimas de extracción (20 mg de muestra en 800 μ L de reactivos de extracción, calentados durante 30 minutos a 100°C) en muestras de alimentos contaminados con trigo. Los valores están expresados en pg ADN_{Tr} / mg y fueron determinados con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo.

IV.1.3.4.3. Concentración de clorhidrato de guanidina

En el método *Wizard*® se consiguen extraer los ácidos nucleicos de las células mediante la acción combinada del SDS, la proteinasa K y el clorhidrato de guanidina. Una vez optimizadas las concentraciones de SDS y proteinasa K, nos quedó por analizar el efecto del aumento de la concentración de guanidina (0,5-4,0 M). Para ello se utilizó la harina de la variedad Aldeano de *Triticum durum* (trigo duro). En dichos ensayos no se observaron diferencias sustanciales en el rendimiento (datos no mostrados) y, por lo tanto, se siguió utilizando la concentración del protocolo original.

IV.1.4. Estudio de la purificación con columnas en el método Wizard®

El sistema de purificación de ADN con columnas *Wizard® Plus Minipreps* ([apartado III.3.2.1](#)) da lugar a extractos con muy bajo rendimiento, pero de una gran pureza ([apartado IV.1.1](#)). Estos estudios se hicieron a partir de los extractos de ADN obtenidos con el método del CTAB, protocolo de extracción que lleva incluido una etapa/fase de purificación mediante precipitación con isopropanol. Por lo tanto, las purificaciones con estas columnas se hicieron a partir de extractos de ADN *limpios*, con valores de pureza (determinada por el cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm) próximos a 1,6.

Con el objetivo de comprobar si se obtenían resultados similares con otros ADNs más sucios, se decidió purificar con columnas los extractos obtenidos con el método *Wizard®*, sin fase de purificación y en las condiciones óptimas de extracción (20 mg de muestra en 800 µL de reactivos de extracción, calentados durante 30 minutos a 100°C). En este caso, se utilizaron columnas *CONCERT™ Rapid Plasmid Miniprep* ([apartado III.3.2.2](#)). En la [Tabla IV.2](#) aparecen las cantidades de ADN de trigo (calculadas con el sistema optimizado de Q-PCR_{Tr}) y las purezas (determinadas por el cociente OD₂₆₀/OD₂₈₀) de los extractos de ADN de una serie de alimentos contaminados con trigo, **antes** y **después** de ser purificados con las columnas. Como se puede observar, la calidad de los extractos de ADN sin purificar (**antes**) era tan baja, con valores de pureza (OD₂₆₀/OD₂₈₀) entre 0,80 y 1,36, que no se pudo cuantificar el ADN por absorbancia, puesto que la *suciedad* (principalmente proteínas) interferiría en la lectura de ODs a 260 nm.

Al purificar estos extractos con las columnas *CONCERT™ Rapid Plasmid Miniprep* (**después**) se mejoró mucho la pureza (aumentos en los valores de OD₂₆₀/OD₂₈₀ entre 0,22 y 0,79). Excepto los extractos purificados de un par de alimentos (un almidón de trigo y una harina de alforfón), el resto dieron valores de pureza por encima de 1,50 ([Tabla IV.2](#)). Estos datos indican que los extractos purificados se encuentran libres de contaminantes celulares y, por lo tanto, pueden ser correctamente cuantificados por absorbancia a 260 nm, mediante la relación $1 \text{ OD}_{260} \approx 50 \text{ µg/ml}$ de ADN_{ds}. Sin embargo, durante el proceso de purificación con columnas se perdió mucha cantidad de ADN, dando lugar a unas recuperaciones muy bajas ([Tabla IV.2](#)) y similares a las obtenidas con las columnas *Wizard®* (recuperaciones inferiores al 15%).

Con estos experimentos queda demostrado y contrastado que la purificación con columnas (*Wizard®* o *CONCERT™*) de extractos de ADN con diferentes grados de suciedad disminuye enormemente el rendimiento global del proceso de extracción (en más de un **85%**). Sin

embargo, los extractos que se obtienen son de una calidad muy superior (ADNs más puros, con menos contaminaciones de proteínas).

Tabla IV.2 Determinación del contenido de ADN de trigo (calculado con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo) y de la pureza (determinada por el cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm) de los extractos de ácidos nucleicos de alimentos contaminados con trigo, antes y después de ser purificados con columnas.

Alimentos	ADN de trigo (ng)			OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	
	Antes	Después	Recuperación ^a (%)	Antes	Después
Harina de trigo ^b	18.500,0	1.917,0	10	1,03	1,73
Almidón de trigo	144,5	13,0	9	0,80	1,34
Papilla de zanahoria	10,3	4,0	39	1,04	1,50
Harina de alforfón	21,8	2,0	9	1,01	1,23
Soja HiSOY [®]	10,6	1,3	12	1,35	1,79
Harina de soja	4,9	0,4	8	1,36	1,80
Potito de arroz	4,6	0,8	17	1,12	1,53
Harina de maíz	8,5	0,9	10	0,97	1,50
Copos de avena	6,1	0,8	14	1,13	1,92

^a Las recuperaciones (%) están calculadas dividiendo la cantidad de ADN de trigo del extracto sin purificar (**antes**) entre la cantidad de ADN de trigo del extracto purificado con columna (**después**), y multiplicado este número por cien.

^b *Triticum durum* (variedad *Aldeano*).

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó con el método Wizard[®] sin fase de purificación y en las condiciones óptimas de extracción (20 mg de muestra en 800 µL de reactivos de extracción, calentados durante 30 minutos a 100°C).

IV.1.5. Estudio del rendimiento / efecto inhibitorio de los extractos del método Wizard[®] sin fase de purificación

En este estudio se utilizaron alimentos negativos por ELISA-R5 y Q-PCR_{Tr} (y agua milli-Q estéril como control) que fueron contaminados con cantidades conocidas del estándar de ADN de trigo, hasta una concentración final de 4 ng ADN_{Tr} por mg/µL. La extracción de los ácidos nucleicos se hizo con el método Wizard[®] sin fase de purificación y en las condiciones optimizadas (20 mg de muestra en 800 µL de reactivos de extracción, calentados durante 30 minutos a 100°C) y el ADN_{Tr} se cuantificó con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo, como se describe en el apartado IV.6.1.

En un mismo análisis se determinó (a) el rendimiento intrínseco del proceso de extracción y (b) la inhibición provocada por los componentes de la matriz de los alimentos. Si durante el proceso de extracción de los ácidos nucleicos hubieran quedado en los extractos sustancias inhibitorias, éstas afectarían a la posterior cuantificación con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo,

obteniéndose unos valores de concentración de ADN_{Tr} más bajos de lo esperado (< 4 ng ADN_{Tr} / mg). En la **Figura IV.5** aparecen los resultados de este estudio, expresados en tanto por ciento de recuperación. De entre todos los alimentos analizados (11), solamente el sirope₂ y el chocolate inhibieron la reacción de Q-PCR, recuperándose tan sólo el 45 y el 65% del ADN_{Tr} añadido a la muestra, respectivamente. En el resto de alimentos analizados (9) se recuperó entre el 81 y el 105% del ADN_{Tr}.

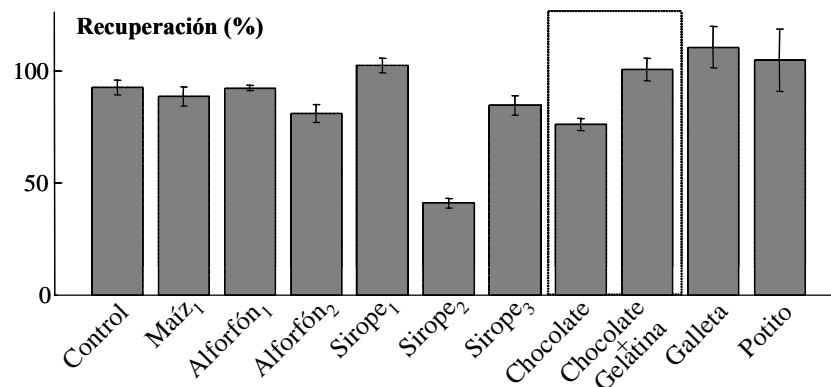


Figura IV.5 Estudio de la recuperación del ADN con el método Wizard[®] sin fase de purificación y en las condiciones óptimas de extracción (20 mg de muestra en 800 µL de reactivos de extracción, calentados durante 30 minutos a 100°C) en alimentos negativos por ELISA-R5 y Q-PCR_{Tr} que fueron contaminados con 4 ng del estándar de ADN de trigo antes del procedimiento de extracción (directamente sobre los 20 mg de muestra). Las recuperaciones y sus correspondientes desviaciones estándar están expresadas en tanto por ciento (%). Los niveles de ADN de trigo se cuantificaron con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo.

Se sabe que los polifenoles de alimentos como el chocolate, el café o el cacao, afectan a la reacción de PCR, principalmente inhibiendo la actividad de la ADN polimerasa (Wilson, 1997; Meyer, 1999) Sin embargo, cuando se volvió a extraer la misma muestra de chocolate con gelatina y PVP (**apartado III.2.2.5**) se aumentó la recuperación del 65 al 95%, quedando demostrada la utilidad de estos reactivos en la eliminación de los polifenoles del extracto de ADN.

Resumiendo, a pesar de la baja calidad del ADN extraído con el método Wizard[®] sin purificar (**apartado III.2.2.4**), no se observaron inhibiciones en la mayoría de las muestras de alimentos contaminadas con cantidades conocidas del estándar de ADN de trigo. Por lo tanto, podemos concluir que la calidad de los extractos es suficiente como para que las reacciones de Q-PCR se lleven a cabo de forma óptima.

La ausencia de inhibidores en el extracto es un requisito importante para obtener un buen rendimiento de amplificación de las secuencias de ADN, que facilite su detección y cuantificación, y mejore la sensibilidad de los sistemas PCR cuantitativa en tiempo-real. No obstante, también fue necesario efectuar la evaluación del rendimiento del ADN en la extracción, ya que el propósito de esta Tesis Doctoral es la detección y cuantificación de ADN de trigo, cebada y/o centeno, que se encuentran en concentraciones muy bajas en las muestras de alimentos “sin-gluten”. De modo que para evitar la obtención de falsos negativos, es imprescindible que haya un número mínimo de dianas amplificables en el extracto de ADN.

A partir del método *Wizard*[®] (Koppel *et al.*, 1998), eliminando la fase/etapa de purificación con columnas y optimizando las condiciones de extracción (el tiempo y la temperatura de incubación, el volumen y la composición de los reactivos de extracción, y la cantidad de muestra), se ha desarrollado/optimizado un nuevo protocolo de extracción de ácidos nucleicos mucho más sencillo, rápido, barato y eficiente que el original, con recuperaciones entre el 81 y el 105%, y que proporciona un ADN de la suficiente *calidad* como para poder ser utilizado directamente en la reacción de Q-PCR, sin necesidad de llevar a cabo un paso posterior de purificación.

IV.2. DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE LOS *PRIMERS*

La unión específica de los *primers* a su correspondiente secuencia diana (*target*) es un requisito necesario para cualquier sistema de PCR. Por lo tanto, la elección de las secuencias adecuadas, así como el diseño y la optimización de las concentraciones de los *primers*, fueron de suma importancia para la puesta a punto de los cuatro sistemas de Q-PCR.

IV.2.1. Selección de las secuencias específicas y diseño de los *primers*

Los genes endógenos de referencia son genes *específicos* de determinadas especies. Se utilizan en la detección de **Organismos Modificados Genéticamente** (*Genetically Modified Organisms* o *GMOs*), donde normalmente el contenido de ADN transgénico se expresa como porcentaje respecto del total de ADN endógeno (presente tanto en el organismo transgénico como en el organismo salvaje). También tienen aplicación en determinados métodos donde la cantidad de un gen diana es normalizada por un gen endógeno, que corrige diferencias en la cantidad total de ácidos nucleicos añadida en cada reacción. Por último, los genes endógenos también funcionan como *Controles Internos Positivos* (*CIPs*), los cuales permiten certificar que el ADN objeto de análisis se ha extraído correctamente.

Tanto el número de copias como la secuencia de los genes endógenos de referencia tienen que estar conservados entre las distintas variedades de la especie objeto de análisis (Hernandez *et al.*, 2001). Por lo tanto, se suelen seleccionar genes con una o muy pocas copias por genoma haploide, para de esta forma asegurar que variedades distintas de la misma especie presentarán pequeñas variaciones en la secuencia o en el número de copias (Hernandez *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2005; Ronning *et al.*, 2006). Esta estrategia proporciona sensibilidades iguales o superiores a 1 genoma haploide por reacción (equivalente a 1 copia del gen endógeno).

Si se utilizasen genes multicopia, se podrían establecer límites de sensibilidad inferiores a 1 genoma [exactamente $(1 / C)$ genomas, siendo "C" el número de copias por genoma]. Sin embargo, en estos casos se corre el riesgo de que variedades distintas de la misma especie presenten variaciones en el número de copias, dando lugar a distintas eficiencias de amplificación con los sistemas de Q-PCR. A pesar de ello, se buscaron secuencias de genes multicopia específicos de trigo, cebada y/o centeno, con el objeto de conseguir desarrollar unos sistemas de Q-PCR con la mayor sensibilidad posible, requisito fundamental para analizar alimentos "sin-gluten", donde incluso pequeñas contaminaciones pueden generar graves problemas al colectivo celiaco. La selección de estas secuencias se llevó a cabo mediante búsquedas en las publicaciones científicas o en la base de datos genética **EMBL/GenBank** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>).

Una vez seleccionadas las secuencias específicas de ADN de trigo, cebada, centeno y trigo/cebada/centeno, se llevó a cabo el diseño de los *primers*. Se estableció un rango de tamaños para cada amplicón entre 50 y 100 pb. La importancia del tamaño del amplicón reside en la necesidad de obtener un número suficiente de moléculas diana amplificables en el extracto de ADN incluso cuando el alimento esté tratado con calor y/o hidrolizado, ya que dichos tratamientos pueden producir la fragmentación de la molécula de ADN. Además, se ha comprobado que según aumenta la longitud de la secuencia diana, la eficiencia de la amplificación disminuye (McCulloch *et al.*, 1995; Zimmermann & Mannhalter, 1996).

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se diseñaron cuatro sistemas de Q-PCR (los criterios fundamentales aplicados en el diseño de los *primers* están especificados en el **apartado III.4**). Inicialmente, se llevó a cabo el diseño de los sistemas individuales de cuantificación de ADN de trigo, cebada y centeno (**Tabla IV.3**). Sin embargo, más adelante se consideró conveniente diseñar otra pareja de *primers* que amplificara una secuencia de ADN conservada en estos tres cereales, para así poder cuantificar simultáneamente (y en una misma reacción de Q-PCR) contaminaciones de trigo, cebada y centeno en alimentos "sin-gluten" (**Tabla IV.4**).

Tabla IV.3 Secuencias y características de los *primers* y los productos de amplificación de los sistemas individuales de cuantificación de ADN de trigo (Q-PCR_{Tr}), cebada (Q-PCR_{Cb}) y centeno (Q-PCR_{Cn}).

Sistema (Cereal)	Nº Acceso GenBank	Orientación (Nombre)	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	%GC ^a	T _m (°C) ^b
Q-PCR _{Tr} (Trigo)	X07841	Directo (W.F1)	CGT CGT GGA CGG AAG TTG A	19	58	59
		Reverso (W.R1)	ACG TGG TTT TGC CCA GTT TT	20	45	58
		Producto de amplificación	CGT CGT GGA CGG AAG TTG ACG CGC GCC ATG GAA AAC TGG GCA AAA CCA CGT	51	59	84
Q-PCR _{Cb} (Cebada)	S70723	Directo (B.F9)	CGT GTT GCA TTC CCC TTT TT	20	45	59
		Reverso (B.R9)	GCT CCC GCG TCA TCC TT	17	65	58
		Producto de amplificación	CGT GTT GCA TTC CCC TTT TTA AAT ATA TTT TTG CGC CAC GTG ACA AGG ATG ACG CGG GAG C	61	48	79
Q-PCR _{Cn} (Centeno)	Z98155	Directo (R.F18)	TTC CAC GTT TGC GAT ACG TTT	21	43	59
		Reverso (R.R22)	GTG CCC AAC GTC GCT GAT	18	61	59
		Producto de amplificación	TTC CAC GTT TGC GAT ACG TTT TAT GCC GGT GCT TAT TAT TCA CGC GTC CAT CAG CGA CGT TGG GCA C	67	51	80

^a Contenido de guaninas (G) y citosinas (C), expresado como porcentaje respecto del total de nucleótidos

^b Temperatura de *melting* calculada con el software *Primer Express*[™] v2.0, que utiliza el algoritmo del “vecino más próximo” (Breslauer y col., 1986)

Tabla IV.4 Secuencias y características de los *primers* y los productos de amplificación del sistema simultáneo de cuantificación de ADN de trigo, cebada y centeno (Q-PCR_{TCC}).

Sistema (Cereal)	Nº Acceso GenBank	Orientación (Nombre)	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	%GC ^a	T _m (°C) ^b
Q-PCR _{TCC} (Trigo)	X75709	Directo (WBR.F8)	ATA ATC AAA TTC TTC AAT TCA AAT TCA AAG	30	20	59
		Reverso (WBR.R8)	TCT CTT TGT CCT CGT CCG ATT AA	23	43	59
Q-PCR _{TCC} (Cebada)	X75705	Producto de amplificación (Trigo)	ATA ATC AAA TTC TTC AAT TCA AAT TCA AAG TTT TCG AGA CAT ATT TAA AAA AGT GGA TTA ATC GGA CGA GGA CAA AGA GA	80	29	71
		Producto de amplificación (Cebada)	ATA ATC AAA TTC TTC AAT TCA AAT TCA AAG TTT TGA GAA CTT TTA AAA AGA AAG TGG ATT AAT CGG ACG AGG ACA AAG AGA	81	28	71
		Producto de amplificación (Centeno)	ATA ATC AAA TTC TTC AAT TCA AAT TCA AAG TTT TCG AGA TCT TTA AAA AAG CGG ATT AAT CGG ACG AGG ACA AAG AGA	78	31	72

^a Contenido de guaninas (G) y citosinas (C), expresado como porcentaje respecto del total de nucleótidos

^b Temperatura de *melting* calculada con el software *Primer Express*[™] v2.0, que utiliza el algoritmo del “vecino más próximo” (Breslauer y col., 1986)

La especificidad teórica de los sistemas de Q-PCR se determinó comparando las secuencias de los amplicones con las secuencias disponibles en el **EMBL/GenBank**. Para ello se utilizó el programa informático **BLAST**[®] (herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). En ningún caso se observó homología alguna con otras especies vegetales distintas de la diana o *target* (datos no mostrados).

IV.2.1.1. Secuencia específica de trigo

Se sabe que ciertas proteínas vegetales de almacenamiento son específicas de determinadas especies. Las secuencias que codifican para algunas de dichas proteínas han sido utilizadas previamente como genes endógenos de referencia en distintos sistemas de Q-PCR (como por ejemplo la *zeína* del maíz o la *lectina* de la soja) (Vaitilingom *et al.*, 1999). Sin embargo, y atendiendo a lo que se ha descrito en la bibliografía (Terzi *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 2005), las gliadinas (o prolaminas del trigo) no se encuentran conservadas entre variedades, especialmente entre las de trigo duro (*Triticum durum*) y trigo blando (*Triticum aestivum*). Por lo tanto, se decidió buscar en la bibliografía otras secuencias de ADN específicas del trigo.

Se seleccionó la “región intergénica limitada por los genes que codifican para los ARN ribosomales 25S y 18S” ([GenBank X07841](#)), utilizada previamente por Köppel y colaboradores en 1998 para detectar ADN de trigo mediante PCR a punto final y geles de agarosa.

Dentro de esta región intergénica 25S-18S, existen cuatro familias (A, B, C y D), cada una de ellas con secuencia repetidas. La familia con mayor número de repeticiones (**Familia A**: región 990-2775) consiste en 12 repeticiones directas de 135-136 pb (Barker *et al.*, 1988).

Con el software **ClustalW/Jalview** (<http://www.es.emblnet.org/cgi-bin/clustalw.cgi>) se alinearon estas 12 repeticiones. Como se puede observar **Figura IV.6**, estas secuencias son prácticamente idénticas, diferenciándose entre si en unas pocas pares de bases. A partir de la secuencia consenso definida, y con la ayuda del software *Primer Express*[™] v2.0, se diseñaron los *primers* **W.F1** y **W.R1** (**Figura IV.6**). Estos *primers* hibridan (con una homología del 100%) con siete de las doce repeticiones y amplifican un fragmento de 51 pares de bases (pb).

(pb)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----												
Consenso	CGTCGTGGACGGAAGTTG ACGCGCGCCATGG AAA ACTGGG CAA ACC ACGT ACGTGGCACACGCCGCGTACACGGACCCTTACACGGAcCCnGTGAACGGGCTGTACGTGGACACGGGAAAAAAGTGCCCGAnCGGC												
01C.....G.....G.....-.....C.G.....-												
02G.....-.....C.G.A.A.....												
03	...C.....G.....A.....C.....-.....A.....-												
04C.....-												
05	...A.....-												
06G.....-												
07C.....-												
08C.....G.....-												
09G.....-												
10	...GC.....C.....-												
11G.....-												
12A.....T.....G.....-												

Figura IV.6 Alineamiento de las 12 repeticiones de la *familia A* de la región intergénica limitada por los genes que codifican para los ARN ribosomales 25S y 18S de *Triticum aestivum* (GenBank / X07841). Las secuencias de los *primers* del sistema de Q-PCR de trigo (W.F1 / W.R1) aparecen en negrita.

IV.2.1.2. Secuencias específicas de cebada y centeno

En esta parte de la Tesis Doctoral se llevó a cabo el desarrollo y optimización de los sistemas individuales de cuantificación de ADN de cebada (Q-PCR_{Cb}) y centeno (Q-PCR_{Cn}). En los experimentos preliminares se utilizaron los genes que codifican para las proteínas de reserva β 1-hordeína y ω -secalina (prolaminas de la cebada y el centeno, respectivamente). Con estos sistemas se obtuvieron unas sensibilidades insuficientes para cuantificar contaminaciones de estos cereales en alimentos “sin-gluten” (datos no mostrados). Hernández y colaboradores (2005) utilizaron el gen de la γ -hordeína para cuantificar por Q-PCR y sondas *TaqMan*[®] contaminaciones de cebada en alimentos. Dicho sistema también presentó un límite de sensibilidad inadecuado (50 pg por reacción).

Finalmente se seleccionó la secuencia del gen que codifica para el ARN ribosomal 5S. Esta secuencia, y en especial la región intergénica **NTS** (*Non-Transcribed Spacer*), presenta muchas diferencias entre especies filogenéticamente próximas, como es el caso del trigo, la cebada y el centeno (Khvyrleva Ts *et al.*, 1988).

Con el programa informático *ClustalW/Jalview* se alinearon las secuencias del “gen que codifica para el ARN ribosomal 5S” de *Triticum aestivum* (GenBank / Z98139), *Secale cereale* (GenBank / Z98155) y *Hordeum vulgare* (GenBank / S70723). No se incluyeron las correspondientes secuencias de otras especies relacionadas (como la avena, el arroz o el maíz), ya que las diferencias entre si eran tan grandes que el software *ClustalW/Jalview* no era capaz de alinearlas con exactitud.

A partir del alineamiento de estas tres secuencias, se seleccionó una zona con una marcada divergencia interespecífica (Z98139: región 30-172; Z98155: región 1-143; S70723: 107-255), y con la ayuda del software *Primer Express*[™] v2.0, se diseñaron los *primers* del sistema de Q-PCR de cebada (**Figura IV.7.A**) y centeno (**Figura IV.7.B**). La pareja de *primers* **B.F9** y **B.R9** amplifica una secuencia de 61 pb de la unión del gen del ARN ribosomal 5S y la región intergénica NTS de *Hordeum vulgare*. La pareja de *primers* **R.F18** y **R.R22** amplifica una secuencia de 67 pb de la región intergénica NTS del gen del ARN ribosomal 5S de *Secale cereale*.

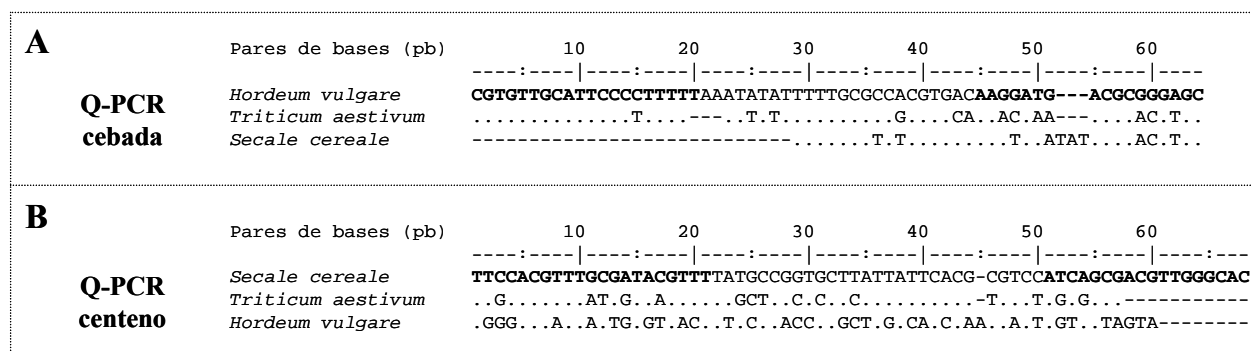


Figura IV.7 Alineamiento de parte de la secuencia del gen que codifica para el ARN ribosomal 5S de *Triticum aestivum* (GenBank / Z98139), *Secale cereale* (GenBank / Z98155) y *Hordeum vulgare* (GenBank / S70723), correspondiente a las regiones de amplificación de los sistemas de **(A)** Q-PCR de cebada y **(B)** Q-PCR de centeno. Las secuencias de los *primers* (B.F9 / B.R9 y R.F18 / R.R22, respectivamente) aparecen en negrita.

IV.2.1.3. Secuencia específica de trigo/cebada/centeno

El objetivo de esta etapa fue buscar una secuencia común entre los genomas de las especies de trigo (*Triticum spp*), cebada (*Hordeum vulgare*) y centeno (*Secale cereale*). Entre las secuencias disponibles en las bases de datos genéticas, se seleccionó el “intrón del gen cloroplastidial trnL”, secuencia utilizada previamente por Dahinden y colaboradores en 2001 para detectar simultáneamente contaminaciones de trigo, cebada y centeno en alimentos “sin-gluten” (Dahinden *et al.*, 2001). Este sistema estaba basado en la PCR competitiva o QC-PCR, que utiliza PCR a punto final y visualiza los productos de amplificación en geles de agarosa (apartados I.3.4.1 y ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

Con el programa informático *ClustalW/ Jalview* se alinearon las secuencias del “intrón del gen cloroplastidial trnL” de trigo, centeno, cebada, avena, arroz y maíz (GeneBank X75709, AF519162, X75705, X75695, X15901 y X86563, respectivamente). A partir de una región bastante conservada entre los genomas del trigo, el centeno y la cebada, y con la ayuda del software *Primer Express*[™] v2.0, se diseñaron los *primers* **WBR.F8** y **WBR.R8** (Figura IV.8). Como se puede apreciar, es el *primer* directo (**WBR.F8**) el que proporciona la especificidad al sistema, ya que solo hibrida (con una homología del 100%) con las secuencias del trigo, el centeno y la cebada. Por otro lado, la secuencia del *primer* reverso (**WBR.R8**) está más conservada entre todas las especies analizadas (Figura IV.8).


```

Pares de bases (pb)      10      20      30      40      50      60      70      80
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Triticum aestivum      ATAATCAAATTCCTTCAATTCAAATCAAAGTTTTCGAGACATATTTAAAA-----AAGTGGATTAATCGGACG-AGGACAAAGAGA
Secale cereale      .....TC-----C.....
Hordeum vulgare      .....AC-----AGA.....T.....
Avena sativa      .....
Oryza sativa      G.....C.....T-----A.TC.T-----C.....T.....
Zea mays      G.....C.....TT-----TC-----TTTTAAA.....T.....

```

Figura IV.8 Alineamiento de parte de la secuencia del intrón del gen cloroplastidial trnL de *Triticum aestivum* (GenBank / X75709), *Secale cereale* (GenBank / AF519162) y *Hordeum vulgare* (GenBank / X75705). En el alineamiento también aparecen las correspondientes secuencias de otras especies relacionadas, como las de *Avena sativa* (GenBank / X75695), *Oryza sativa* (GenBank / X15901) y *Zea mays* (GenBank / X86563). Las secuencias de los *primers* del sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno (WBR.F8 / WBR.R8) aparecen en negrita.

IV.2.2. Optimización de las concentraciones de los *primers*

La afinidad de los *primers* por el ADN molde no siempre es la misma, por lo tanto hubo que averiguar qué concentración de cada uno de ellos era la adecuada para obtener por Q-PCR una mayor y mejor respuesta. Para ello se diseñó una *matriz de primers*, combinando distintas concentraciones del *primer* directo (50 nM, 150 nM, 300 nM, 500 nM) con el *primer* reverso (50 nM, 150 nM, 300 nM, 500 nM).

Con cada combinación de *primers*, se amplificó (por duplicado) 1 ng del respectivo estándar de ADN, la dilución 1/5 de los extractos de ADN de distintos controles negativos y el NTC (sólo mezcla de reacción, sin ADN molde). Se escogieron las combinaciones que proporcionaron:

- (a) En el caso del estándar de ADN, los valores de C_T más bajos con las mayores fluorescencias.
- (b) En el caso de los controles negativos y el NTC, los valores de C_T más altos con las menores fluorescencias.

En la **Tabla III.3** aparecen detalladas las concentraciones óptimas calculadas con estas *matrices de primers* para cada sistema de Q-PCR.

IV.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS SOPORTES Y REACTIVOS DE LA Q-PCR

Para que los sistemas de Q-PCR se llevaran a cabo en las mejores condiciones, se optimizaron todos los elementos del sistema, tanto a nivel de *rendimiento* como de *costes*. Para ello, se tuvo que establecer: (a) por un lado, el mejor soporte físico donde llevar a cabo las reacciones de Q-PCR, es decir, las placas y los *films* adhesivos y, (b) por otro lado, los reactivos de dicha reacción.

IV.3.1. Optimización de las placas y films adhesivos

En cuanto a las **placas** y los **films adhesivos**, se probaron los de las siguientes casas comerciales:

- Placas de PCR de 96 pocillos → *Applied Biosystems, Bio-Rad y Eppendorf.*
- Films adhesivos → *Applied Biosystems, Bio-Rad y Sigma-Aldrich.*

No se observó ninguna diferencia significativa entre las distintas placas / *films* (datos no mostrados), así que se decidió utilizar las más económicas: placas de *Eppendorf* y *films* adhesivos de *Sigma-Aldrich*.

IV.3.2. Optimización de la concentración de cloruro de magnesio

Una vez seleccionadas las secuencias específicas y diseñados/optimizados los *primers* de los cuatro sistemas de Q-PCR (apartado IV.2), se optimizó el $MgCl_2$. Se ensayaron distintas concentraciones (desde 1 hasta 6 mM), consiguiendo una respuesta óptima con 5,0 mM para el sistema simultáneo de trigo/cebada/centeno y con 2,5 mM para los sistemas individuales de trigo, cebada y centeno (datos no mostrados). Las concentraciones usadas de $MgCl_2$ y del resto de reactivos de la Q-PCR aparecen detalladas en la Tabla III.3.

IV.4. PREPARACIÓN DE UNOS ESTÁNDARES BASADOS EN LA MEZCLA O POOL DE LOS ADNS PURIFICADOS A PARTIR DE DISTINTAS VARIEDADES DE TRIGO, CEBADA Y CENTENO

IV.4.1. Estudio de la variabilidad intraespecífica

Los sistemas de Q-PCR específicos de una determinada especie deben amplificar, con la misma eficiencia, el ADN procedente de cualquier variedad, para así poder evitar infra o sobreestimaciones en la cantidad de ADN dependiendo de la variedad contaminante (la cuál se desconoce en la mayoría de los casos). Para ello, tanto el número de copias como la secuencia de los genes diana tienen que estar conservadas entre las distintas variedades de la especie objeto de análisis (Hernandez *et al.*, 2001).

En primer lugar, se procedió a la extracción y purificación del ADN de cuarenta y cuatro variedades de trigo, cebada y centeno (apartado III.3). Con los datos obtenidos de **concentración** y **pureza**, se ajustaron todos los extractos purificados de ADN a 5 ng/μl con agua milli-Q estéril.

El siguiente paso fue amplificar los ADNs purificados (1 ng) de las 25 variedades de *Triticum spp* (10 de *Triticum durum* y 15 de *Triticum aestivum*), las 14 variedades de *Hordeum vulgare* y las 4 variedades de *Secale cereale* con los sistemas optimizados de Q-PCR de trigo, cebada y centeno, respectivamente. Como se puede observar en la Figura IV.9, los valores obtenidos fueron muy similares, tanto en las variedades de *Triticum spp* [C_T (media \pm DE) = 16,68 \pm 0,50], de *Hordeum vulgare* (C_T = 19,54 \pm 0,42) y de *Secale cereale* (C_T = 21,31 \pm 0,56), analizadas con los sistemas optimizados de Q-PCR de trigo, cebada y centeno, respectivamente. Esta pequeña variabilidad observada en los tres sistemas de Q-PCR puede ser debida (i) a pequeñas diferencias en la calidad de los extractos purificados de ADN (que influyan en el número de secuencias diana amplificadas durante la posterior reacción de PCR) (Holst-Jensen & Berdal, 2004), (ii) a errores en el pipeteo durante la preparación de las diluciones, o (iii) a una cuantificación imprecisa de las concentraciones de ADN de los extractos purificados. Estas pequeñas variaciones de C_T son similares a las obtenidas con otros sistemas de Q-PCR publicados en la bibliografía (Tabla IV.5). Hernández y colaboradores (2004) obtuvieron unas variaciones en los valores de C_T entre 20 variedades de *Zea mays* de hasta 2,90 ciclos (Tabla IV.5). Durante el 2005 y el 2006 han salido publicados distintos sistemas de Q-PCR de trigo y

cebada, con variaciones en los valores de C_T entre variedades de *Triticum spp* y *Hordeum vulgare* (respectivamente) de $25,24 \pm 0,85$ y $24,36 \pm 0,43$ (Hernandez *et al.*, 2005), y de hasta 1,70 y 1,80 ciclos (Ronning *et al.*, 2006) (**Tabla IV.5**).

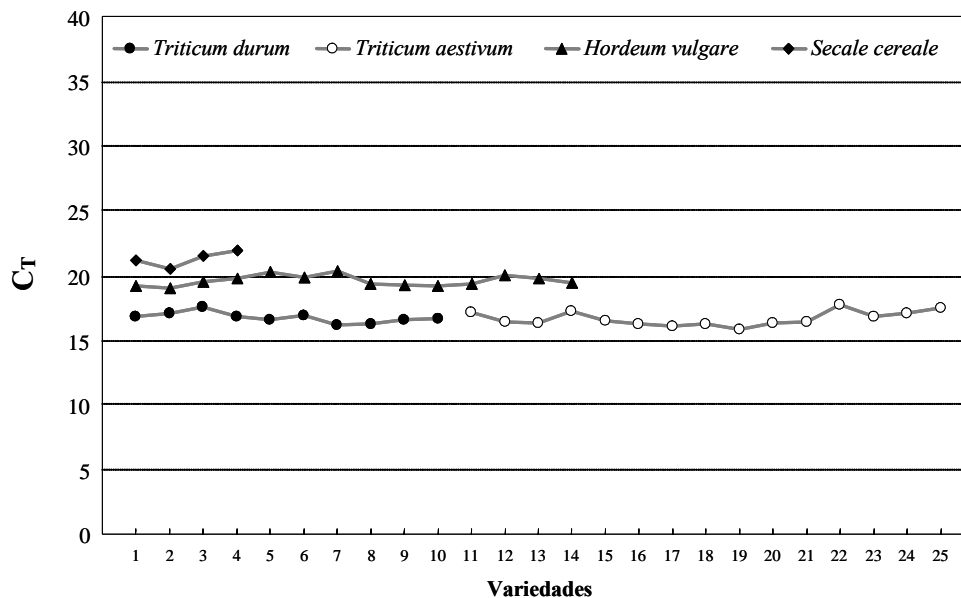


Figura IV.9 Valor medio de las C_T de los ADNs purificados (1 ng) de 25 variedades de *Triticum spp* [10 de *Triticum durum* (1, Anento; 2, Artena; 3, Angre; 4, Anton; 5, Regallo; 6, Cibeles; 7, Aldeano; 8, Jabato; 9, Araldun; 10, Roqueño) y 15 de *Triticum aestivum* (11, Abanto; 12, Amiro; 13, Admiral; 14, Festin; 15, Ampuero; 16, Adalid; 17, Ritmo; 18, Bandit; 19, Tambor; 20, Vivant; 21, Bussard; 22, Apuesto; 23, Recital; 24, Almonte; 25, Amon)], 14 variedades de *Hordeum vulgare* (1, Reinette; 2, Alpha; 3, Grosso; 4, Hassan; 5, Icare; 6, Cresta; 7, Cameo; 8, Volga; 9, Clarine; 10, Scarlett; 11, County; 12, Pewter; 13, Prestige; 14, Vanessa) y 4 variedades de *Secale cereale* (1, Merkator; 2, Petkus; 3, Macada; 4, Retamar) amplificadas con los sistemas optimizados de Q-PCR de trigo, cebada y centeno, respectivamente.

Hay que destacar que el número de copias por célula del gen diana (*target*) puede variar con el nivel de *ploidía* de la planta (Terzi *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 2005). Sin embargo, con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo no se han encontrado diferencias significativas entre los valores de C_T de las variedades de trigo duro “tetraploide” ($16,72 \pm 0,39$) y trigo blando “hexaploide” ($16,64 \pm 0,56$) (**Figura IV.9**).

El bajo nivel de variación en los valores de C_T de los tres sistemas de Q-PCR indica que el número de copias y la secuencia de las regiones de los genes seleccionados (**Tabla IV.3**) están conservadas entre las distintas variedades estudiadas. Además, queda demostrado que los sistemas desarrollados de Q-PCR son adecuados para cuantificar ADN de trigo, cebada y centeno en alimentos “sin-gluten” contaminados con variedades desconocidas de estos tres cereales.

Tabla IV.5 Comparación de los valores de C_T (ciclos) obtenidos al amplificar por Q-PCR la misma cantidad de ADN de distintas variedades de una misma especie diana.

Publicación	Especie diana	Secuencia diana o <i>target</i>	N° Variedades	Valores C_T (ciclos)	
				ΔC_T^a	DE ^b
Hernández <i>et al.</i> , 2004	Maíz	<i>Alcohol deshidrogenasa</i>	20	2,90	
	Maíz	<i>Grupo proteico de alta movilidad</i>	20	1,14	
	Maíz	<i>Invertasa A</i>	20	1,82	
	Maíz	<i>Zeína</i>	20	1,49	
Hernández <i>et al.</i> , 2005	Trigo	<i>RALiasa</i>	28		0,85
	Cebada	<i>γ-hordeína</i>	15		0,43
	Arroz	<i>Gos9</i>	20		0,30
	Girasol	<i>Heliantina</i>	26		0,39
Ronning <i>et al.</i> , 2006	Trigo	<i>Serina/treonina protein quinasa</i>	10	1,70	
	Cebada	<i>Serina/treonina protein quinasa</i>	9	1,80	
Tesis Doctoral	Trigo	<i>Intergén ARNr 25S-18S</i>	25	1,97	0,50
	Cebada	<i>ARNr 5S</i>	14	1,35	0,42
	Centeno	<i>ARNr 5S</i>	4	1,42	0,56

^a Los incrementos de C_T (ΔC_T) están calculados a partir de la diferencia entre el mayor y el menor de los valores de C_T obtenidos con las variedades analizadas

^b Desviación estándar

IV.4.2. Preparación de los estándares de ADN

Para poder cuantificar de forma *absoluta* las contaminaciones de trigo, cebada y/o centeno en muestras de alimentos fue necesario calcular primero la concentración de los estándares de ADN por un método independiente de los sistemas de Q-PCR. En este caso se cuantificó por absorbancia a 260 nm, utilizando la relación $1 \text{ OD}_{260} \approx 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de ADN_{ds} (Sambrook *et al.*, 1989).

Puesto que los *primers* hibridan de forma ligeramente distinta dependiendo de la variedad ([apartado IV.4.1](#)), se decidió mezclar volúmenes equivalentes de las soluciones de 5 ng/ μl de los ADNs purificados a partir de las distintas variedades de trigo (25), cebada (14) y centeno (4). Para la preparación de los estándares se utilizó ADN de la mayor calidad posible: purificado con columnas *Wizard*[®] / *CONCERT*[™] (siguiendo el protocolo del [apartado III.3](#)).

La preparación de unos estándares de ADN adecuados es importante para disponer de unas referencias que validen nuestros sistemas en todo momento y para generar las curvas de calibrado externas con las cuales cuantificar de forma absoluta el ADN de trigo, cebada y/o centeno en muestras de alimentos.

IV.5. PUESTA A PUNTO DE UN SISTEMA DE TINCIÓN DE GELES DE AGAROSA MÁS SENSIBLE QUE EL BROMURO DE ETIDIO

Se hicieron diluciones seriadas 1/2 (en tampón TAE 1x) del producto de amplificación del sistema de Q-PCR de trigo obtenido al amplificar 1 pg del correspondiente estándar de ADN, dando lugar a los siguientes puntos: 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 fg. La **Figura IV.10** muestra las electroforesis de todas estas diluciones en geles de agarosa al 3% (w/v) teñidos con (A) *bromuro de etidio* y (B) con *SYBR[®] Green I* (**apartado III.6.2.5**).

Como se puede observar en la **Figura IV.10**, con el gel de agarosa teñido con *bromuro de etidio* sólo se ven las bandas de 500, 250 y 125 fg, mientras que con el *SYBR[®] Green I* se ven todas las bandas, quedando demostrada su mayor sensibilidad (hasta 4 veces superior).

La tinción con *SYBR[®] Green I* fue introducida a mediados de la década de los noventa por la casa comercial *Molecular Probes*, con el fin de ofrecer un producto menos tóxico que el bromuro de etidio, con mayor sensibilidad para la visualización de ADN en geles de agarosa y con un ámbito de fluorescencia que permitiera aplicaciones cuantitativas. El *SYBR[®] Green I* puede emplearse:

- (a) Tiñendo las muestras, antes de la electroforesis (añadiéndolo al tampón de carga).
- (b) Tiñendo el gel, antes de que polimerice o tras la electroforesis.

Según las instrucciones del fabricante, la mayor sensibilidad del *SYBR[®] Green I* se obtiene añadiéndolo directamente al gel de agarosa, antes de que se enfríe. En nuestras manos, este método es 4 veces más sensible que los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

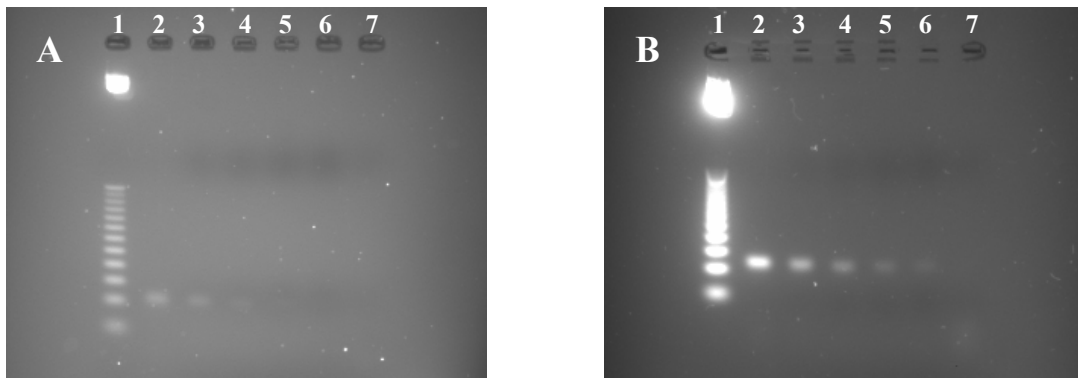


Figura IV.10 Electroforesis en geles de agarosa al 3% (w/v) conteniendo (A) bromuro de etidio y (B) SYBR[®] Green I 1x. Se cargaron 12 μ L por pocillo (10 μ L producto de PCR + 2 μ L tampón de carga) de distintas diluciones del producto de amplificación del sistema de Q-PCR de trigo obtenido al amplificar 1 pg del correspondiente estándar de ADN. (1): MW; (2): 500 fg; (3): 250 fg; (4): 125 fg; (5): 62,5 fg; (6): 31,25 fg; (7): NTC.

Una vez optimizado el sistema de tinción de geles de agarosa, se sometieron a electroforesis los productos de amplificación de los cuatro sistemas desarrollados de Q-PCR (basados en el fluoróforo SYBR[®] Green I). Como se puede observar en la [Figura IV.11](#), la resolución de la técnica fue suficiente para diferenciar las bandas de ADN de los productos de amplificación de los sistemas de Q-PCR de trigo, cebada, centeno y trigo/cebada/centeno (51, 61, 67, y 78-81 pb respectivamente).

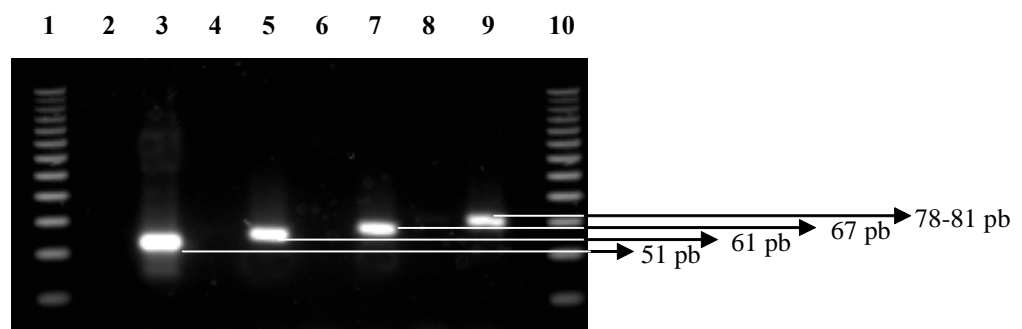


Figura IV.11 Electroforesis en gel de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR[®] Green I 1x de los productos de amplificación de los sistemas de Q-PCR de trigo, cebada, centeno y trigo/cebada/centeno obtenidos al analizar 1 ng de sus correspondientes estándares de ADN. Se cargaron 12 μ L (10 μ L producto de PCR + 2 μ L tampón de carga) por pocillo. (1) y (10): MW; (3): 1 ng del estándar de ADN de trigo; (5): 1 ng del estándar de ADN de cebada; (7): 1 ng del estándar de ADN de centeno; (9): 1 ng del estándar de ADN de trigo/cebada/centeno; (2), (4), (6) y (8): NTCs.

IV.6. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE 4 SISTEMAS DE Q-PCR PARA LA RÁPIDA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN (INDIVIDUAL O SIMULTÁNEA) DE ADN DE TRIGO, CEBADA Y CENTENO

- **Condiciones de amplificación**

Los *primers* específicos de los sistemas de Q-PCR de trigo, cebada, centeno y trigo/cebada/centeno ([Tabla IV.3](#) y [Tabla IV.4](#)) se usaron para amplificar fragmentos de ADN de 51, 61, 67 y 78-81 pb, respectivamente. En una primera fase de nuestros estudios se optimizaron las concentraciones de los *primers* ([apartado IV.2.2](#)) y del cloruro de magnesio ([apartado IV.3.2](#)) de cada uno de los sistemas de Q-PCR. Los *primers* se diseñaron siguiendo los criterios de la “*Líneas Universales de Diseño*” ([apartado III.4](#)). Estos criterios permitieron utilizar las mismas condiciones de amplificación para los cuatro sistemas de Q-PCR ([Tabla III.6](#)), facilitando la cuantificación de distintas especies en el mismo ensayo de Q-PCR. Lo único que cambia entre un sistema y otro es el número de ciclos de desnaturalización/hibridación (las reacciones de Q-PCR se pararon antes de que los controles negativos o los NTCs cruzasen el umbral de detección o *threshold*).

- **Curvas de calibrado**

Utilizando las condiciones óptimas, se amplificaron (por duplicado y en dos experimentos en paralelo) las distintas diluciones de los estándares de ADN con los respectivos sistemas de Q-PCR. En la [Tabla IV.6](#) y en la [Figura IV.12](#) se muestran las medias de los valores de C_T de cada dilución, obtenidas con los cuatro sistemas de Q-PCR, tras ajustar el umbral de detección o *threshold* a 0,2 unidades de fluorescencia (UF). Los cuatro coeficientes de correlación (R^2) están por encima de 0,9900, lo que indica un buen ajuste lineal de los datos experimentales y, por lo tanto, su idoneidad para la cuantificación absoluta de ADN.

Tabla IV.6 Comparación de los valores de C_T (ciclos) obtenidos al amplificar con los sistemas de Q-PCR individuales (trigo, cebada y centeno) y simultáneo (TCC) distintas diluciones de sus respectivos estándares de ADN.

pg ADN / reacción	Valores de C_T : Media (DE ^a)								Recta de regresión	Eficiencia ^b (%)
	10.000	1.000	100	10	5	1	0,2	0,1		
Sistemas de Q-PCR										
Trigo	-	16,54 (0,19)	20,08 (0,06)	23,60 (0,12)	-	27,38 (0,18)	29,78 (0,23)	31,05 (0,24)	$Y = -3,6182 \cdot X + 27,332$	89,0
Cebada	-	19,75 (0,12)	23,37 (0,01)	26,86 (0,22)	27,84 (0,12)	30,23 (0,28)	-	-	$Y = -3,4918 \cdot X + 30,288$	93,4
Centeno	18,34 (0,11)	21,72 (0,17)	25,33 (0,07)	28,72 (0,14)	29,66 (0,10)	-	-	-	$Y = -3,4511 \cdot X + 32,139$	94,9
TCC	20,29 (0,08)	23,60 (0,06)	27,11 (0,06)	30,25 (0,18)	31,40 (0,25)	-	-	-	$Y = -3,3530 \cdot X + 33,705$	98,7

^a Desviación estándar

^b Las eficiencias de las curvas de calibrado se han calculado aplicando la fórmula $E (\%) = [10^{-(1/Pendiente)} - 1] \cdot 100$ (Watanabe y col., 1991)

Las pendientes de las curvas de regresión reflejan la eficiencia de los sistemas de Q-PCR. La pendiente de una curva de calibrado con una eficiencia del 100% tiene un valor (absoluto) de 3,322, que son los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. A medida que se pierde eficiencia, aumenta la pendiente y, por lo tanto, los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. Con los datos de la **Tabla IV.6**, y aplicando la fórmula:

$$E (\%) = [10^{-(1/Pendiente)} - 1] \cdot 100 \text{ (Watanabe et al., 1991),}$$

se calcularon unas eficiencias medias para los cuatro sistemas de Q-PCR superiores al 89%.

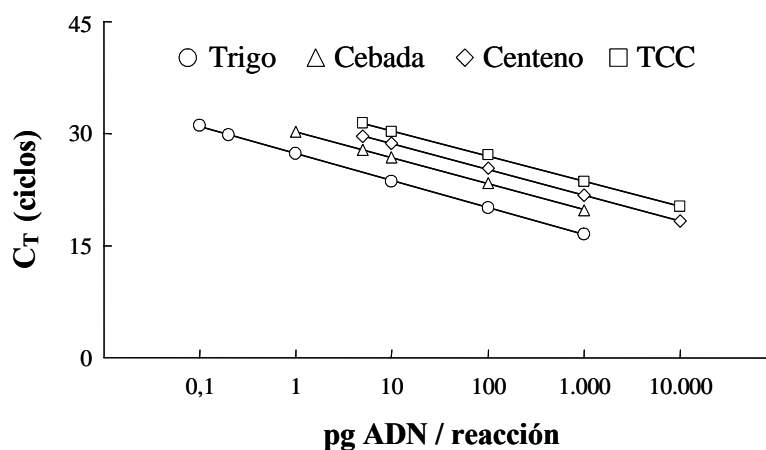


Figura IV.12 Rectas de regresión de los sistemas de Q-PCR individuales (trigo, cebada y centeno) y simultáneo (TCC) calculadas a partir de las distintas cantidades de los respectivos estándares de ADN (pg / reacción) y de sus correspondientes valores de C_T (ciclos). Para la elaboración de esta figura se han utilizado los datos de la **Tabla IV.6**. El eje de abscisas (pg ADN / reacción) está en escala logarítmica.

- **Límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD)**

Para calcular el límite de cuantificación (LOQ) y detección (LOD) de los cuatro sistemas desarrollados de Q-PCR, se amplificaron con dichos sistemas cantidades decrecientes de los respectivos estándares de ADN. Como zona o región de *cuantificación* se estableció aquella donde los logaritmos de las cantidades de ADN mostraban una buena correlación lineal con sus respectivos valores de C_T ($R^2 > 0,9900$) y con unas desviaciones estándar de los valores de C_T de los duplicados inferiores a 0,380 ciclos.

En los sistemas de Q-PCR de trigo y cebada, el LOQ coincide con el LOD: 0,2 pg ADN_{Tr} y 1 pg ADN_{Cb} por reacción. Sin embargo, en los sistemas de Q-PCR de centeno y de trigo/cebada/centeno, también se detectaron contaminaciones por debajo del LOQ (< 5 pg ADN por reacción) mediante geles de agarosa teñidos con SYBR[®] Green I. En este rango, conocido como zona o región de *detección*, no se pudieron calcular las medias de los duplicados de las muestras, puesto que se obtuvieron unas desviaciones estándar de los valores de C_T superiores a 0,380 ciclos.

IV.6.1. Sistema individual de Q-PCR de trigo

IV.6.1.1. Especificidad del sistema

Para determinar la especificidad de los *primers* **W.F1** y **W.R1** se amplificaron con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo 1.000 pg de ADN purificado a partir de harinas de trigo (*Triticum spp*), de cereales relacionados filogenéticamente, como el triticale (*Triticosecale spp*), el centeno (*Secale cereale*), la cebada (*Hordeum vulgare*), la avena (*Avena sativa*), el maíz (*Zea mays*) o el arroz (*Oryza sativa*), y de otras especies vegetales distanciadas filogenéticamente, pero que son la base de muchos alimentos “sin-gluten”, como la soja (*Glycine max*) o el alforfón (*Fagopyrum esculentum*). Se utilizaron los mismos métodos de extracción, purificación y cuantificación de ADN que los empleados con las variedades de los estándares de ADN ([apartado III.3](#)). En la [Figura IV.13.A](#) se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación. Las harinas de trigo y triticale (híbrido entre el trigo y el centeno) dieron positivo, con unas bandas del tamaño esperado (51 pb), mientras que el resto de muestras no dieron ninguna señal. El control negativo de la reacción de amplificación (NTC), donde el extracto de ADN se sustituye por agua milli-Q estéril, tampoco dio señal alguna.

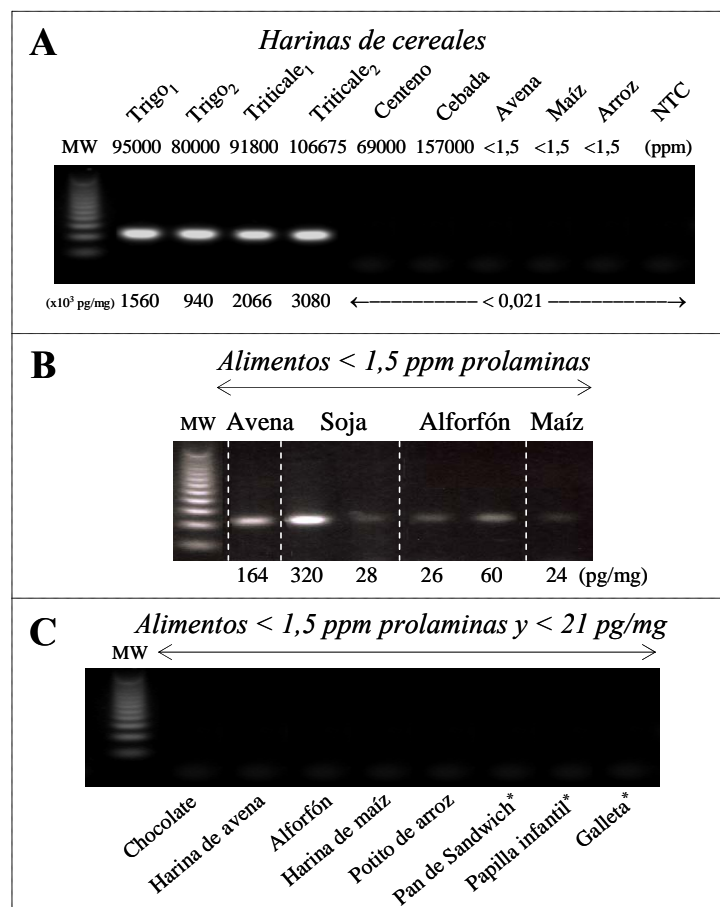


Figura IV.13 Electroforesis en geles de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR® Green I 1x de los productos de amplificación del sistema de Q-PCR de trigo obtenidos al analizar **(A)** distintas harinas de cereales utilizados como controles de especificidad, **(B)** alimentos negativos por ELISA-R5 Sandwich (< 1,5 ppm de prolaminas) pero positivos por el sistema optimizado de Q-PCR de trigo y **(C)** alimentos negativos por ambos métodos (contaminaciones inferiores a 21 pg ADN_{Tr} / mg). * Muestras de alimentos tratados con calor.

A continuación se generaron las curvas de disociación (o curvas de *melting*) de estas harinas utilizadas como controles de especificidad (**Figura IV.14**, izquierda) y de 5 muestras de alimentos contaminados con trigo (**Figura IV.14**, derecha). En estas gráficas se observa un único pico de disociación, que se corresponde con el producto específico de amplificación (de 51 pb). Tiene una T_m de 81,0°C ($\pm 0,2^\circ\text{C}$), que coincide aproximadamente con el valor teórico de 84,0°C calculado con el algoritmo del “vecino más próximo” (Breslauer *et al.*, 1986). No se observa ningún pico secundario debido a productos inespecíficos de amplificación o a dímeros de *primers*.

La forma de las curvas de disociación está muy relacionada con las bandas que se puedan observar en los geles de agarosa. La altura del pico depende de la cantidad de producto amplificado y, por lo tanto, de la intensidad de la banda (picos altos dan lugar a bandas

intensas). Y la anchura refleja la resolución del producto de amplificación: picos estrechos significan bandas muy bien definidas (productos de amplificación muy homogéneos).

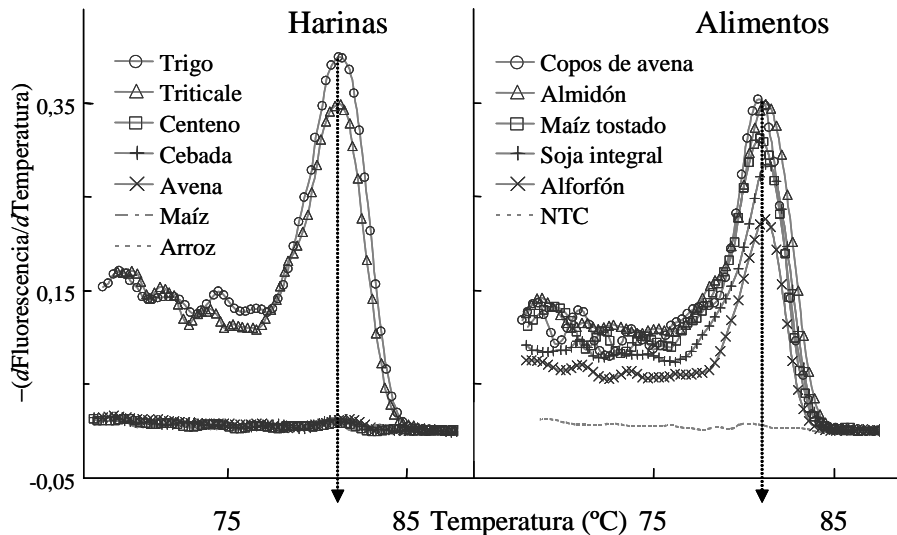


Figura IV.14 Curvas de disociación (o curvas de *melting*) de los productos de amplificación del sistema optimizado de Q-PCR de trigo de distintas harinas de cereales utilizados como controles de especificidad (**izquierda**) y de cinco muestras de alimentos contaminados con trigo (**derecha**). Las flechas señalan la T_m (temperatura de *melting*, disociación o fusión) del producto específico de amplificación ($81,0^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$).

Se ha conseguido diseñar un par de *primers* que amplifican, con un alto nivel de especificidad, una secuencia específica del trigo (tanto *Triticum durum* como *Triticum aestivum*), de sus variedades y de sus cruces con otros cereales, como por ejemplo, el triticale (híbrido entre el trigo y el centeno); y no manifiestan reactividad cruzada con otras especies (centeno, cebada, avena, maíz, arroz, soja, alforfón...).

También se analizaron varios alimentos negativos por ELISA-R5 Sandwich ($< 1,5$ ppm de prolaminas). Aunque la mayoría de las muestras también dieron negativo por el sistema optimizado de Q-PCR de trigo (**Figura IV.13.C**), en algunas de ellas se detectaron pequeñas contaminaciones de este cereal, entre 24 y 320 pg de ADN de trigo por miligramo de muestra (**Figura IV.13.B**). Para comprobar que estos resultados eran ciertos, y no simplemente falsos positivos, se hicieron *Western Blot R5* con algunas de estas muestras, concentrando 500 μL de los extractos etanólicos (**apartado III.7.5**). En todas ellas aparecieron unas bandas entre 30 y 40 kDa (datos no mostrados), que se corresponden con las prolaminas del trigo o *gliadinas*. Por lo tanto, se puede concluir que el sistema de detección/cuantificación de ADN de trigo por Q-PCR es más sensible que el método inmunológico de ELISA-R5 Sándwich, basado en la detección/cuantificación de prolaminas (proteínas).

IV.6.1.2. Elaboración de la curva estándar de ADN de trigo

Para la preparación del estándar se utilizaron los extractos de ADN de 25 variedades de trigo, purificados con columnas *Wizard*[®] / *CONCERT*[™] (siguiendo el protocolo del [apartado III.3](#)). El siguiente paso fue amplificar con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo 1.000 pg del ADN purificado de cada una de las 25 variedades de *Triticum spp* (10 de *Triticum durum* y 15 de *Triticum aestivum*). Como se puede observar en la [Figura IV.15.A](#), las curvas de amplificación (*amplification plots*) obtenidas fueron muy similares [C_T (media \pm DE) = $16,68 \pm 0,49$; $n=50$]. Hay que destacar que el número de copias por célula del gen diana (*target*) puede variar con el nivel de *ploidía* de la planta (Terzi *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 2005). Sin embargo, con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo no se han encontrado diferencias significativas entre las variedades de trigo duro (tetraploide) y trigo blando (hexaploide).

El bajo nivel de variación en los valores de C_T indica que el número de copias y la secuencia de la región del gen seleccionado (región intergénica limitada por los genes que codifican para los ARN ribosomales 25S y 18S) está conservada entre las distintas variedades estudiadas. Además, queda demostrado que el sistema desarrollado de Q-PCR es adecuado para cuantificar ADN de trigo en alimentos “sin-gluten” contaminados con variedades desconocidas de este cereal.

Puesto que los *primers* **W.F1** y **W.R1** hibridan de forma ligeramente distinta dependiendo de la variedad de trigo utilizada, se decidió mezclar 50 μ l de las soluciones de 5 ng/ μ l de los ADNs purificados a partir de las 25 variedades de trigo ($50 \mu\text{l} \times 25 = 1.250 \mu\text{l} \equiv 1,25 \text{ ml}$). En la [Figura IV.15.B](#) se muestra la curva de amplificación de 1 ng de esta mezcla o *pool* (estándar de ADN de trigo). Para cuantificar el ADN de trigo en muestras problema se emplearon curvas de calibrado elaboradas a partir de diluciones seriadas del estándar de ADN de trigo ([apartado III.3.3](#)). La [Figura IV.15.C](#) muestra las curvas de amplificación de una típica curva de calibrado: 1.000, 100, 10, 1, 0,2 y 0,1 pg por reacción (equivalentes a 57, 5,7, 0,57, 0,057, 0,011 y 0,006 genomas haploides por reacción).

Una vez terminada la reacción de amplificación, el programa *ABI PRISM*[®] *7000 SDS v1.1* generó un gráfico de los logaritmos de las cantidades del estándar de ADN de trigo contra sus correspondientes valores de C_T . El resultado de la regresión lineal de estos puntos se muestra en el inserto de la [Figura IV.15.C](#). El ajuste de los datos experimentales a la recta de regresión calculada fue muy bueno, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9998. La cuantificación de ADN de trigo en muestras problema se hizo interpolando en esta recta de regresión los valores de C_T obtenidos.

La pendiente de la recta de calibrado refleja la eficiencia del sistema. La pendiente de una recta de calibrado con una eficiencia del 100% tiene un valor (absoluto) de 3,322, que son los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. A medida que se pierde eficiencia, aumenta la pendiente y, por lo tanto, los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. Aplicando la fórmula $E (\%) = [10^{-(1/Pendiente)} - 1] \cdot 100$ (Watanabe et al., 1991), se calculó una eficiencia media del sistema de Q-PCR de trigo del 89%.

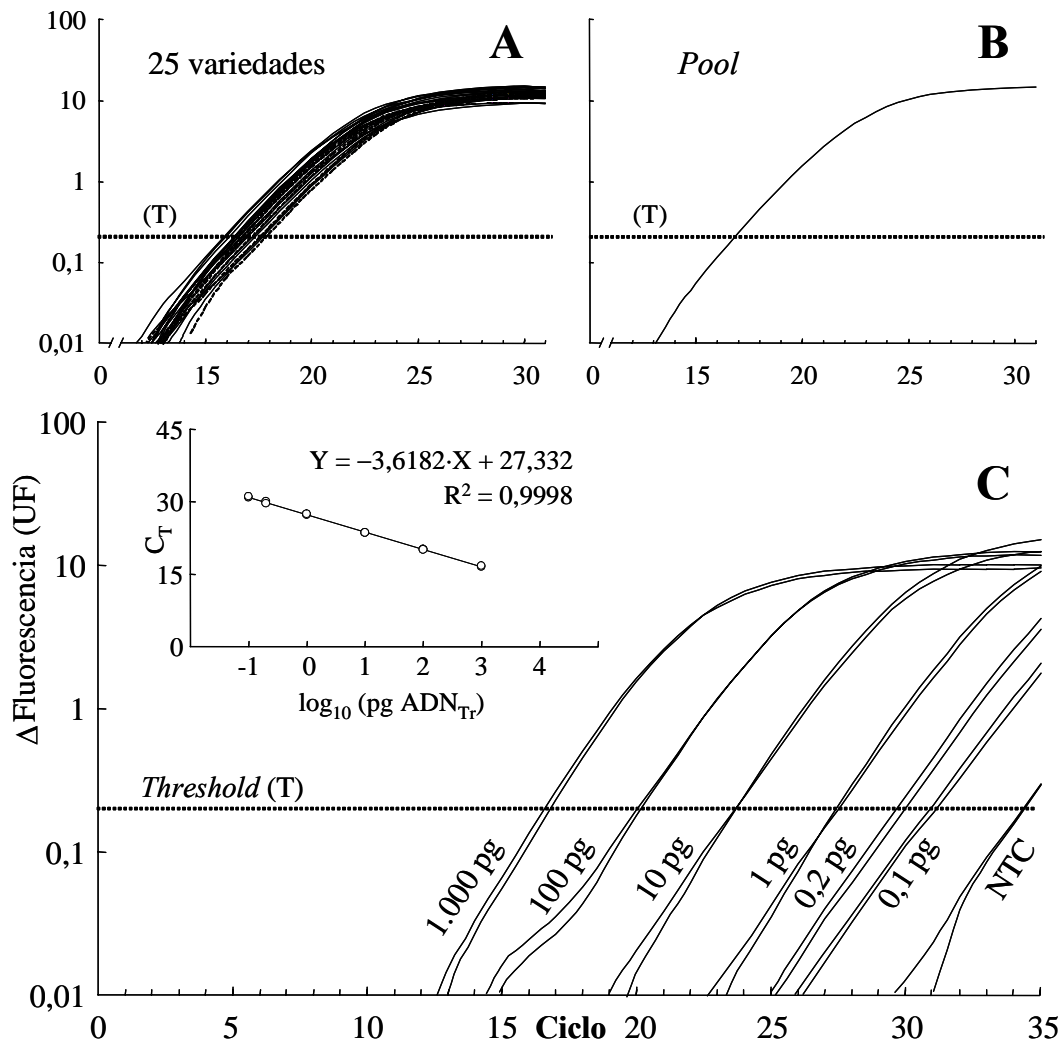


Figura IV.15 (A) Curvas de amplificación de 1.000 pg de cada uno de los extractos de ADN purificados a partir de 25 variedades distintas de trigo y (B) de su mezcla o *pool* (estándar de ADN de trigo). (C) Curva estándar de ADN de trigo, desde 1.000 hasta 0,1 pg. El inserto muestra el ajuste lineal de la correspondiente recta de calibrado. En todos los experimentos se fijó la línea del umbral de detección o *threshold* (T) en 0,2 UF.

IV.6.1.3. Estabilidad de la curva estándar y de los extractos de ADN a 4°C

IV.6.1.3.1. Curva estándar

Para este estudio, se hizo un seguimiento en el tiempo (durante un periodo de 50 días) de las diluciones 500, 50, 5 y 0,5 pg ADN_{Tr} / μL, almacenadas todas ellas a 4°C. Como se puede observar en la **Figura IV.16.A**, cuando se prepararon las diluciones de la curva de calibrado (t = 0) los valores de C_T de estas cuatro diluciones se ajustaron perfectamente (R² = 0,9997) a la recta de regresión de ecuación $C_T = -3,5014 \cdot \log (\text{pg ADN}_{Tr} / \mu\text{L}) + 24,506$. Sin embargo, después de 10 días almacenadas a 4°C, el punto más diluido de la curva de calibrado (0,5 pg ADN_{Tr} / μL) abandonó la linearidad, aumentando su valor de C_T aproximadamente 6 ciclos (de 25,57 a 31,33). 40 días más tarde, se observó algo similar con la dilución 5 pg ADN_{Tr} / μL. Sólo los valores de C_T de las diluciones más concentradas (500 y 50 pg ADN_{Tr} / μL) se mantuvieron constantes durante todo este tiempo (con unas desviaciones estándar de 0,08 y 0,31 ciclos, respectivamente).

Las curvas estándar de la **Figura IV.16.B** se hicieron en paralelo con las de la **Figura IV.16.A**, con la diferencia de que las diluciones se prepararon y se utilizaron en el momento (desechándose a continuación). Como se puede observar, en este caso se obtuvo una alta reproducibilidad. Las desviaciones estándar de los valores de C_T de las diluciones 500, 50, 5 y 0,5 pg ADN_{Tr} / μL fueron de 0,03, 0,16, 0,14 y 0,31 ciclos, respectivamente (n=6; tres días distintos).

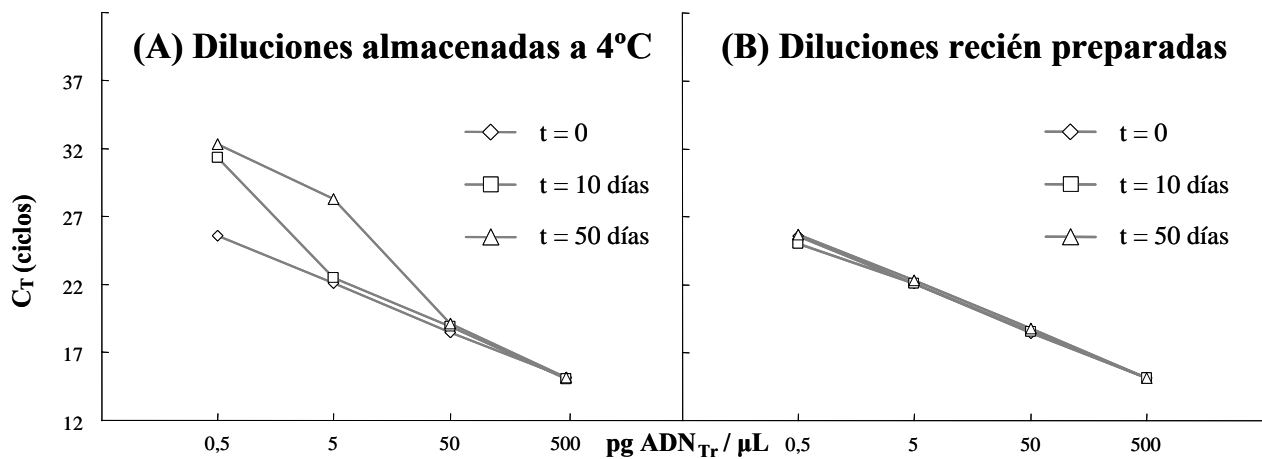


Figura IV.16 Estabilidad de las diluciones del estándar de ADN de trigo (500, 50, 5 y 0,5 pg ADN_{Tr} / μL). **(A)** Las mismas diluciones del estándar de ADN de trigo, almacenadas a 4°C y analizadas en tres días distintos: en el momento en el que se prepararon las diluciones (t = 0) y después de 10 y 50 días. **(B)** Estas tres curvas estándar se hicieron en paralelo con las de la [Figura IV.16.A](#), con la diferencia de que las diluciones se prepararon y se utilizaron en el momento (desechándose a continuación). Los valores de C_T (ciclos) son los obtenidos con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo. El eje de abscisas (pg ADN_{Tr} / μL) está en escala logarítmica.

Los resultados obtenidos demostraron que los puntos más diluidos del estándar de ADN de trigo (5 y 0,5 pg ADN_{Tr} / μL) no eran estables a 4°C. Probablemente, las moléculas ADN de estas diluciones, al encontrarse en solución acuosa y en estado puro, se degradaron con mayor facilidad que aquellas más concentradas. Con el objetivo de aumentar su estabilidad, algunos autores en vez de diluir el estándar de ADN en agua milli-Q estéril, utilizan soluciones de BSA (Hernandez *et al.*, 2005) o de ADN de salmón (Yamashita *et al.*, 2006). En nuestro caso, se decidió preparar diluciones nuevas cada día, a partir del *stock* del estándar de ADN de trigo (5.000 pg ADN_{Tr} / μL) en agua milli-Q estéril.

IV.6.1.3.2. Extractos de ADN

Para determinar si se podían reutilizar los extractos de ADN del método *Wizard*[®] sin fase de purificación y en las condiciones óptimas de extracción descritas en el [apartado III.2.2.4](#), se estudió la estabilidad de los extractos de ADN de dos alimentos de soja almacenados a 4°C. Se analizaron las diluciones 1/5 de los extractos de ADN (con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo) en tres días distintos: en el momento en el que se extrajo el ADN (t = 0) y al cabo de 1 y 4 meses. Como se puede observar en la [Figura IV.17](#), los valores de C_T se mantuvieron constantes durante todo este tiempo, con desviaciones estándar inferiores a 0,21 ciclos (n=6; tres días distintos). Por lo tanto, se puede concluir que los extractos de ADN se pueden conservar a 4°C durante al menos 4 meses.

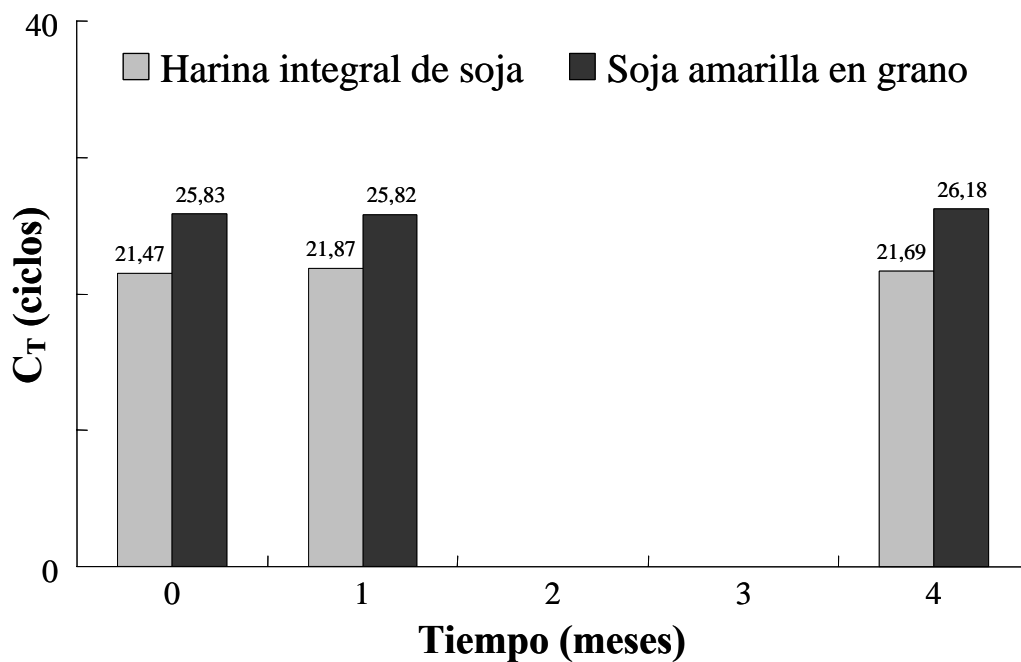


Figura IV.17 Estabilidad de los extractos de ADN (de una harina integral de soja y de una soja amarilla en grano) conservados a 4°C y analizados en tres días distintos: en el momento en el que se extrajo el ADN ($t = 0$) y al cabo de 1 y 4 meses. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó con el método Wizard® sin fase de purificación y en las condiciones óptimas de extracción (20 mg de muestra en 800 μ L de reactivos de extracción, calentados durante 30 minutos a 100°C). Los valores de C_T (ciclos), obtenidos con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo, son los correspondientes a la dilución 1/5 de los extractos.

IV.6.1.4. Límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD)

Para calcular el límite de cuantificación (LOQ) del sistema de Q-PCR de trigo, se amplificaron con dicho sistema cantidades decrecientes del estándar de ADN de trigo. El sistema desarrollado permite detectar y cuantificar contaminaciones de este cereal en un rango muy amplio (más de cuatro órdenes de magnitud). Se puede cuantificar hasta 0,2 pg de ADN de trigo (equivalente a 0,011 genomas haploides) por reacción (**Figura IV.15.C**). En la actualidad, éste es el sistema más sensible de cuantificación de ADN de trigo en alimentos (Hernandez *et al.*, 2005; Ronning *et al.*, 2006).

Si en cada región intergénica 25S-18S hay 12 copias de la secuencia diana (**apartado IV.2.1.1**), y suponiendo que el sistema de Q-PCR_{Tr} pueda llegar a detectar hasta 1 copia por reacción, dicha región intergénica 25S-18S estaría repetida unas 7 veces en cada genoma haploide del trigo.

El límite de detección (LOD) o sensibilidad del sistema se estableció analizando una harina de maíz negativa por ELISA-R5 y Q-PCR_{Tr} contaminada con cantidades conocidas de trigo (*Triticum durum*, variedad Araldun; *Triticum aestivum*, variedad Recital) hasta unos niveles finales de prolaminas de 350, 62,5, 20, 11,5, 5, 2,5 y <1,5 ppm. Como se puede observar en la **Figura IV.18**, con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo se detectaron y cuantificaron contaminaciones de este cereal por debajo del límite de cuantificación del ELISA-R5 Sándwich (<1,5 ppm de prolaminas). Estos resultados aportan validez a los obtenidos con ciertas muestras de alimentos negativos por ELISA-R5 que también dieron positivo por el sistema de Q-PCR de trigo (**Figura IV.13.B**).

Por lo tanto, se puede concluir que el sistema de detección/cuantificación de ADN de trigo por Q-PCR es más sensible que el método inmunológico de ELISA-R5 Sándwich, basado en la detección/cuantificación de prolaminas (proteínas).

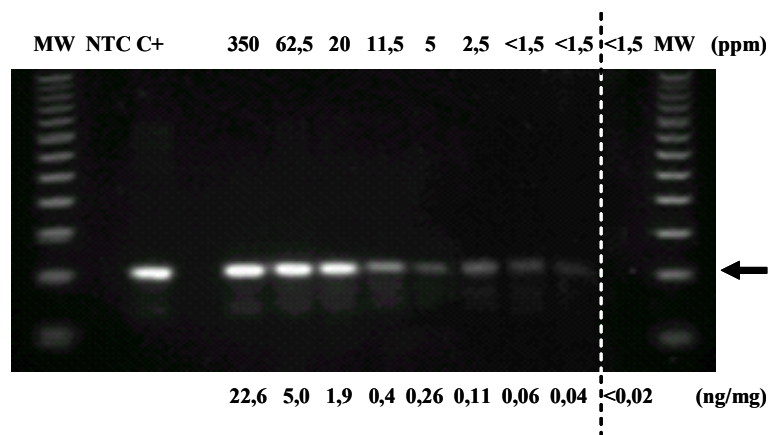


Figura IV.18 Electroforesis en gel de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR[®] Green I 1x de los productos de amplificación del sistema de Q-PCR de trigo de una harina de maíz contaminada con distintas cantidades de trigo (*Triticum durum*, variedad Araldun; *Triticum aestivum*, variedad Recital). El contenido de prolaminas (ppm) se cuantificó con el ELISA-R5 Sandwich y los niveles de ADN (ng ADN_{Tr} / mg) se determinaron con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo. C+: Control positivo (100 pg del estándar de ADN de trigo). Con una flecha se señala el producto específico de amplificación (51 pb).

IV.6.1.5. Reproducibilidad

A continuación se realizó un estudio de reproducibilidad para todo el procedimiento (extracción de los ácidos nucleicos con el método *Wizard*[®] sin fase de purificación y cuantificación del ADN con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo). Para ello se seleccionaron dos alimentos contaminados con distintos niveles de prolaminas: una galleta de alforfón (97 ppm) y una harina de avena (195 ppm). En la **Tabla IV.7** se muestra el coeficiente de variación obtenido para siete extractos distintos de la galleta de alforfón, analizados por duplicado en el mismo día y con la misma curva estándar [$C_T = -3,3927 \cdot \log (\text{pg ADN}_{Tr} / \text{reacción}) + 25,9774$; $R^2=0,9998$]. También aparece el coeficiente de variación obtenido para cuatro extractos distintos de la harina de avena, analizados por duplicado en cuatro días distintos, con sus respectivas curvas estándar [todas ellas con coeficientes de correlación (R^2) por encima de 0,9900 y con eficiencias superiores al 90%].

Tabla IV.7 Reproducibilidad en la cuantificación del ADN de trigo de un par de alimentos contaminados con prolaminas (galleta de alforfón y harina de avena), para el mismo día y para cuatro días distintos.

Muestra	Tipo de análisis	Media (pg ADN_{Tr} / mg)	CV^a
Galleta de alforfón (97 ppm prolaminas)	Mismo día ^b , distintos extractos (n=14)	1.330	3,41
Harina de avena (232 ppm prolaminas)	Cuatro días ^c , distintos extractos (n=8)	241	11,01

^a Coeficiente de variación (%)

^b Misma curva estándar [$C_T = -3,3927 \cdot \log (\text{pg ADN}_{Tr} / \text{reacción}) + 25,9774$; $R^2=0,9998$]

^c Distintas curvas estándar [todas con coeficientes de correlación (R^2) por encima de 0,9900 y con eficiencias superiores al 90%]

Como se puede observar, los coeficientes de variación fueron de 3,41% para el mismo día (n=14) y de 11,01% para cuatro días distintos (n=8). Estos resultados son muy buenos si se tiene en cuenta que los métodos actuales basados en la Q-PCR proporcionan coeficientes de variación que van desde 17,3 hasta 26,0% en la cuantificación de 1% de maíz y soja transgénica (Hubner *et al.*, 2001; Brodmann *et al.*, 2002; Höhne *et al.*, 2002; Pardigol *et al.*, 2003).

IV.6.2. Sistema individual de Q-PCR de cebada

IV.6.2.1. Especificidad del sistema

Para determinar la especificidad de los *primers* B.F9 y B.R9 se amplificaron con el sistema optimizado de Q-PCR de cebada los extractos de ADN (dilución 1/5) de distintas harinas de cereales: harina de maíz contaminada al 10% (w/w) con harina de trigo (*Triticum spp*), centeno (*Secale cereale*) y triticale (*Triticosecale spp*); 100% harina de cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*). Se utilizó el método de extracción desarrollado y optimizado en esta Tesis Doctoral ([apartado III.2.2.4](#)). La harina de cebada fue la única que dio positivo, con una banda del tamaño esperado (61 pb), mientras que el resto de muestras no dieron ninguna señal (datos no mostrados). El control negativo de la reacción de amplificación (NTC), donde el extracto de ADN se sustituye por agua milli-Q estéril, tampoco dio señal alguna.

A continuación se generaron las curvas de disociación (o curvas de *melting*) de los productos de amplificación de estas *harinas* utilizadas como controles de especificidad ([Figura IV.19](#), izquierda) y de 5 muestras de *alimentos* contaminados con cebada ([Figura IV.19](#), derecha). En estas gráficas se observa un único pico de disociación, que se corresponde con el producto específico de amplificación (de 61 pb). Tiene una T_m de 76,8°C ($\pm 0,2^\circ\text{C}$), que coincide aproximadamente con el valor teórico de 79,0°C calculado con el algoritmo del “vecino más próximo” (Breslauer *et al.*, 1986). No se observa ningún pico secundario debido a productos inespecíficos de amplificación o a dímeros de *primers*.

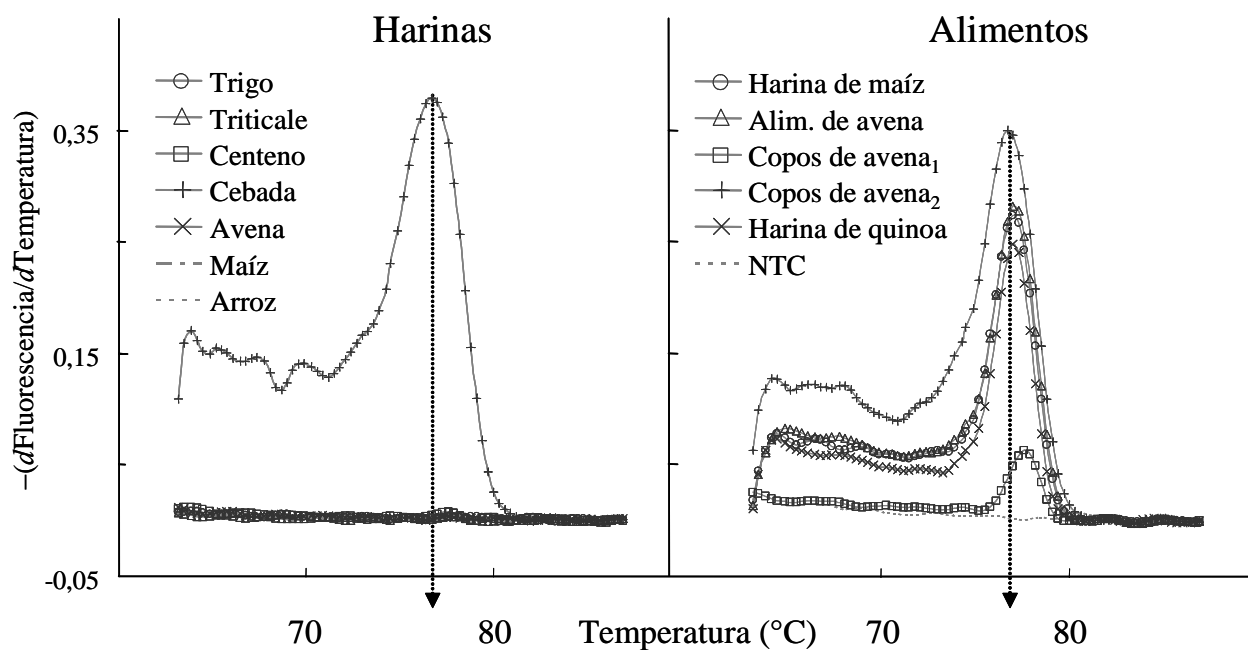


Figura IV.19 Curvas de disociación (o curvas de *melting*) de los productos de amplificación del sistema optimizado de Q-PCR de cebada de distintas harinas de cereales [harina de maíz contaminada al 10% (w/w) con harina de trigo, centeno y triticale; 100% harina de cebada, avena, maíz y arroz] utilizados como controles de especificidad (*izquierda*) y de cinco muestras de alimentos contaminados con cebada (*derecha*). Las flechas señalan la T_m (temperatura de *melting*, disociación o fusión) del producto específico de amplificación ($76,8^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$).

Se ha conseguido diseñar un par de *primers* que amplifican, con un alto nivel de *especificidad*, una secuencia específica de la cebada (*Hordeum vulgare*) y de sus variedades; y no manifiestan reactividad cruzada con otras especies (trigo, centeno, triticale, avena, maíz, arroz...).

IV.6.2.2. Elaboración de la curva estándar de ADN de cebada

Para la preparación del estándar se utilizaron los extractos de ADN de 14 variedades de cebada, purificados con columnas *Wizard® / CONCERT™* (siguiendo el protocolo del [apartado III.3](#)). El siguiente paso fue amplificar con el sistema optimizado de Q-PCR de cebada 1.000 pg del ADN purificado de cada una de las 14 variedades de *Hordeum vulgare*. Como se puede observar en la [Figura IV.20.A](#), las curvas de amplificación (*amplification plots*) obtenidas fueron muy similares [C_T (media \pm DE) = $19,54 \pm 0,42$; $n=28$].

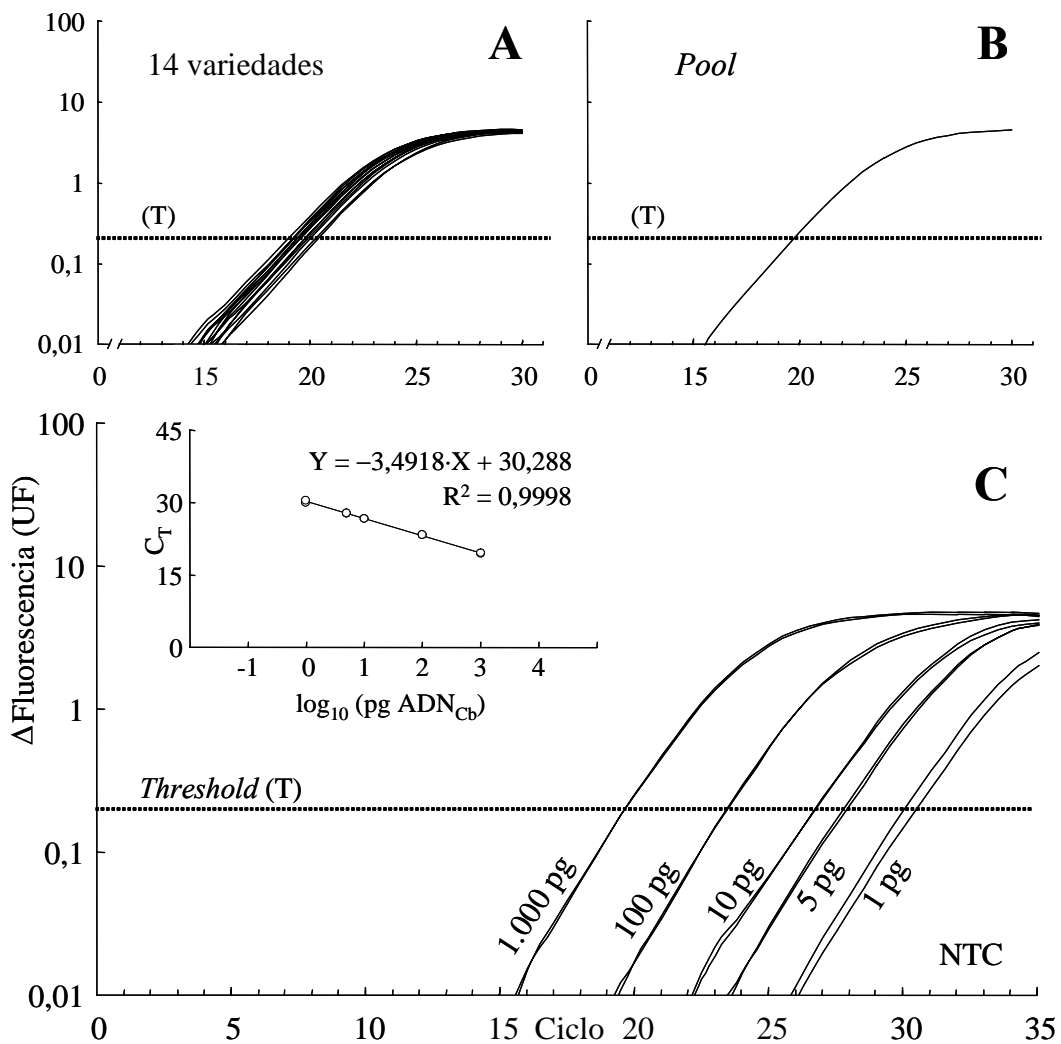


Figura IV.20 (A) Curvas de amplificación de 1.000 pg de cada uno de los extractos de ADN purificados a partir de 14 variedades distintas de cebada y (B) de su mezcla o *pool* (estándar de ADN de cebada). (C) Curva estándar de ADN de cebada, desde 1.000 hasta 1 pg. El inserto muestra el ajuste lineal de la correspondiente recta de calibrado. En todos los experimentos se fijó la línea del umbral de detección o *threshold* (T) en 0,2 UF.

El bajo nivel de variación en los valores de C_T indica que el número de copias y la secuencia de la región del gen seleccionado (ARN ribosomal 5S) está conservada entre las distintas variedades estudiadas. Además, queda demostrado que el sistema desarrollado de Q-PCR es adecuado para cuantificar ADN de cebada en alimentos “sin-gluten” contaminados con variedades desconocidas de este cereal.

Puesto que los *primers* **B.F9** y **B.R9** hibridan de forma ligeramente distinta dependiendo de la variedad de cebada utilizada, se decidió mezclar 100 μl de las soluciones de 5 ng/ μl de los ADNs purificados a partir de las 14 variedades de cebada ($100 \mu\text{l} \times 14 = 1.400 \mu\text{l} \approx 1,40 \text{ ml}$). En la **Figura IV.20.B** se muestra la curva de amplificación de 1 ng de esta mezcla o *pool* (estándar de ADN de cebada).

Para cuantificar el ADN de cebada en muestras problema se emplearon curvas de calibrado elaboradas a partir de diluciones seriadas del estándar de ADN de cebada (**apartado III.3.3**). La **Figura IV.20.C** muestra las curvas de amplificación de una típica curva de calibrado: 1.000, 100, 10 y 1 pg por reacción (equivalentes a 187, 18,7, 1,87 y 0,187 genomas haploides por reacción).

Una vez terminada la reacción de amplificación, el programa *ABI PRISM® 7000 SDS v1.1* generó un gráfico de los logaritmos de las cantidades del estándar de ADN de trigo contra sus correspondientes valores de C_T . El resultado de la regresión lineal de estos puntos se muestra en el inserto de la **Figura IV.20.C**. El ajuste de los datos experimentales a la recta de regresión calculada fue muy bueno, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9998. La cuantificación de ADN de cebada en muestras problema se hizo interpolando en esta recta de regresión los valores de C_T obtenidos.

La pendiente de la recta de calibrado refleja la eficiencia del sistema. La pendiente de una recta de calibrado con una eficiencia del 100% tiene un valor (absoluto) de 3,322, que son los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. A medida que se pierde eficiencia, aumenta la pendiente y, por lo tanto, los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. Aplicando la fórmula $E (\%) = [10^{-(1/Pendiente)} - 1] \cdot 100$ (Watanabe et al., 1991), se calculó una eficiencia media del sistema de Q-PCR de cebada del 93,4%.

IV.6.2.3. Límite de cuantificación (LOQ)

Para calcular el límite de cuantificación (LOQ) del sistema de Q-PCR de cebada, se amplificaron con dicho sistema cantidades decrecientes del estándar de ADN de cebada. El sistema desarrollado permite detectar y cuantificar contaminaciones de este cereal en un rango muy amplio (hasta cuatro órdenes de magnitud). Se puede cuantificar hasta 1 pg de ADN de cebada (equivalente a 0,187 genomas haploides) por reacción (**Figura IV.20.C**). En la actualidad, éste es el sistema más sensible de cuantificación de ADN de cebada en alimentos (Hernandez *et al.*, 2005; Ronning *et al.*, 2006).

Si en cada gen ribosomal 5S hay una copia de la secuencia diana y suponiendo que el sistema de Q-PCR_{Cb} pueda llegar a detectar hasta 1 copia por reacción, dicha gen ribosomal 5S estaría repetido unas 5 veces en cada genoma haploide de la cebada.

IV.6.2.4. Reproducibilidad

A continuación se realizó un estudio de reproducibilidad para todo el procedimiento (extracción de los ácidos nucleicos con el método *Wizard*[®] sin fase de purificación y cuantificación del ADN con el sistema optimizado de Q-PCR de cebada). Se utilizó la misma harina de avena seleccionada para el estudio de reproducibilidad del sistema de Q-PCR de trigo (apartado IV.6.1.5), contaminada con 232 ppm de prolaminas. En la Tabla IV.8 se muestran los coeficientes de variación obtenidos para cuatro extractos analizados por duplicado en el mismo día y con la misma curva estándar [$C_T = -3,4482 \cdot \log (\text{pg ADN}_{Cb} / \text{reacción}) + 29,2911$; $R^2=0,9992$] y para siete extractos analizados por duplicado en siete días distintos con sus respectivas curvas estándar [todas ellas con coeficientes de correlación (R^2) por encima de 0,9900 y con eficiencias superiores al 90%]. Como se puede observar, se obtuvo una buena reproducibilidad, con coeficientes de variación del 3,72% para el mismo día (n=8) y del 11,92% para siete días distintos (n=14). Estos resultados son muy similares a los obtenidos para el sistema optimizado de Q-PCR de trigo: 3,41% para el mismo día (n=14) y 11,01% para cuatro días distintos (n=8).

Tabla IV.8 Reproducibilidad en la cuantificación del ADN de cebada de una harina de avena contaminada con 232 ppm de prolaminas, para el mismo día y para siete días distintos.

Tipo de análisis	Media (pg ADN_{Cb} / mg)	CV^a
Mismo día^b, distintos extractos (n=8)	1.785	3,72
Siete días^c, distintos extractos (n=14)	1.821	11,92

^a Coeficiente de variación (%)

^b Misma curva estándar [$C_T = -3,4482 \cdot \log (\text{pg ADN}_{Cb} / \text{reacción}) + 29,2911$; $R^2=0,9992$]

^c Distintas curvas estándar [todas con coeficientes de correlación (R^2) por encima de **0,9900** y con eficiencias superiores al **90%**]

IV.6.3. Sistema individual de Q-PCR de centeno

IV.6.3.1. Especificidad del sistema

Para determinar la especificidad de los *primers* R.F18 y R.R22 se amplificaron con el sistema optimizado de Q-PCR de centeno 1.000 pg de ADN purificado a partir de harinas de centeno (*Secale cereale*), de cereales relacionados filogenéticamente, como el trigo (*Triticum spp*), la cebada (*Hordeum vulgare*), la avena (*Avena sativa*), el maíz (*Zea mays*) o el arroz (*Oryza sativa*), y de otras especies vegetales distanciadas filogenéticamente, pero que son la base de muchos alimentos “sin-gluten”, como la soja (*Glycine max*) o el alforfón (*Fagopyrum esculentum*). Se utilizaron los mismos métodos de extracción, purificación y cuantificación de ADN que los empleados con las variedades de los estándares de ADN (apartado III.3). La harina de centeno fue la única que dio positivo, con una banda del tamaño esperado (67 pb), mientras que el resto de muestras no dieron ninguna señal (datos no mostrados). El control negativo de la reacción de amplificación (NTC), donde el extracto de ADN se sustituye por agua milli-Q estéril, tampoco dio señal alguna.

A continuación se generaron las curvas de disociación (o curvas de *melting*) de los productos de amplificación de estas *harinas* utilizadas como controles de especificidad (Figura IV.21, izquierda) y de 5 muestras de *alimentos* contaminados con centeno (Figura IV.21, derecha). En estas gráficas se observa un único pico de disociación, que se corresponde con el producto específico de amplificación (de 67 pb). Tiene una T_m de 79,2°C ($\pm 0,2^\circ\text{C}$), que coincide aproximadamente con el valor teórico de 80,0°C calculado con el algoritmo del “vecino más próximo” (Breslauer *et al.*, 1986). No se observa ningún pico secundario debido a productos inespecíficos de amplificación o a dímeros de *primers*.

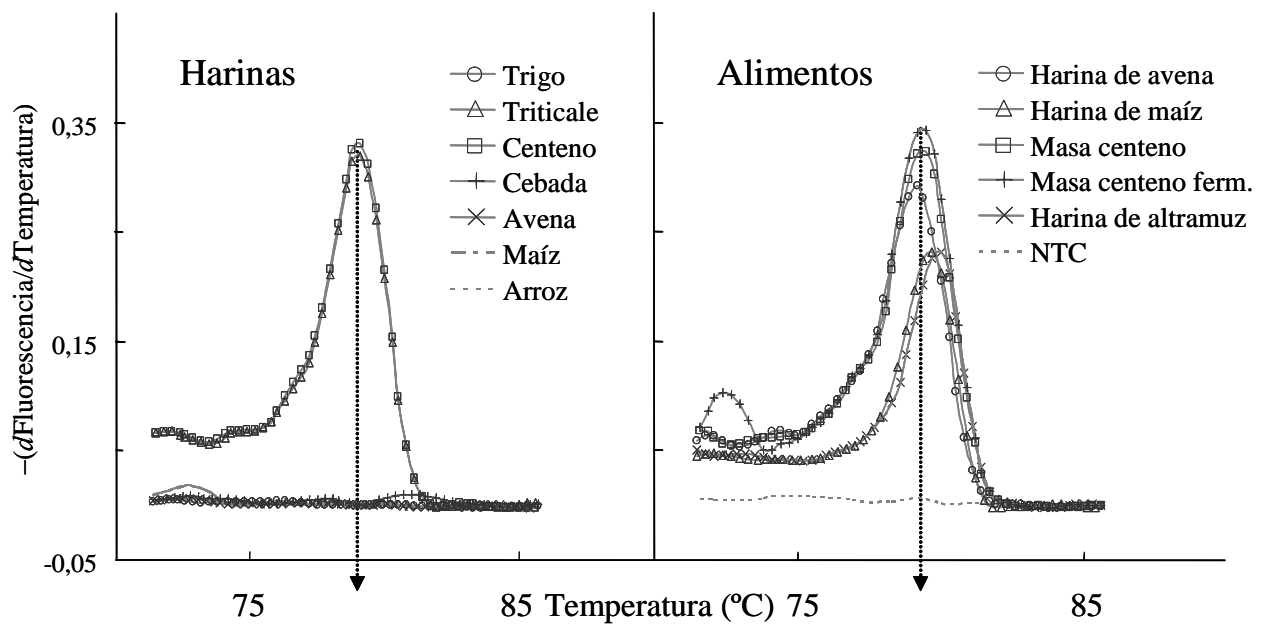


Figura IV.21 Curvas de disociación (o curvas de *melting*) de los productos de amplificación del sistema optimizado de Q-PCR de centeno de distintas harinas de cereales utilizados como controles de especificidad (*izquierda*) y de cinco muestras de alimentos contaminados con centeno (*derecha*). Las flechas señalan la T_m (temperatura de *melting*, disociación o fusión) del producto específico de amplificación ($79,2^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$).

Se ha conseguido diseñar un par de *primers* que amplifican, con un alto nivel de *especificidad*, una secuencia específica del centeno, de sus variedades y de sus cruces con otros cereales, como por ejemplo, el triticale (híbrido entre el trigo y el centeno); y no manifiestan reactividad cruzada con otras especies (trigo, cebada, avena, maíz, arroz, soja, alforfón...).

IV.6.3.2. Elaboración de la curva estándar de ADN de centeno

Para la preparación del estándar se utilizaron los extractos de ADN de 4 variedades de centeno, purificados con columnas *Wizard® / CONCERT™* (siguiendo el protocolo del [apartado III.3](#)). El siguiente paso fue amplificar con el sistema optimizado de Q-PCR de centeno 1.000 pg del ADN purificado de cada una de las 4 variedades de *Secale cereale*. Como se puede observar en la Figura IV.22.A, las curvas de amplificación (*amplification plots*) obtenidas fueron muy similares [C_T (media \pm DE) = $21,31 \pm 0,56$; n=8].

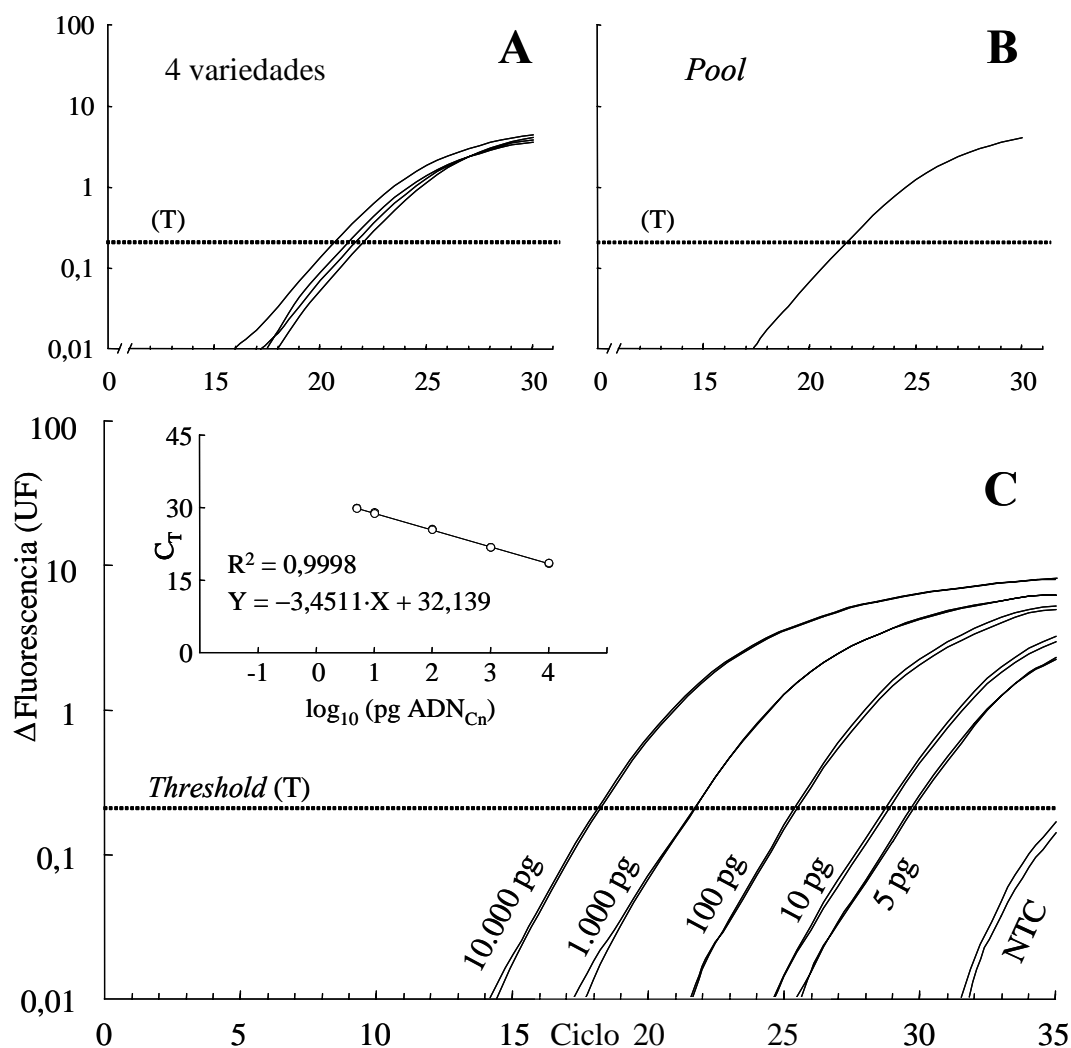


Figura IV.22 (A) Curvas de amplificación de 1.000 pg de cada uno de los extractos de ADN purificados a partir de 4 variedades distintas de centeno y (B) de su mezcla o *pool* (estándar de ADN de centeno). (C) Curva estándar de ADN de centeno, desde 10.000 hasta 5 pg. El inserto muestra el ajuste lineal de la correspondiente recta de calibrado. En todos los experimentos se fijó la línea del umbral de detección o *threshold* (T) en 0,2 UF.

El bajo nivel de variación en los valores de C_T indica que el número de copias y la secuencia de la región del gen seleccionado (ARN ribosomal 5S) está conservada entre las distintas variedades estudiadas. Además, queda demostrado que el sistema desarrollado de Q-PCR es adecuado para cuantificar ADN de centeno en alimentos "sin-gluten" contaminados con variedades desconocidas de este cereal.

Puesto que los *primers* R.F18 y R.R22 hibridan de forma ligeramente distinta dependiendo de la variedad de centeno utilizada, se decidió mezclar 300 µl de las soluciones de 5 ng/µl de los ADNs purificados a partir de las 4 variedades de centeno ($300 \mu\text{l} \times 4 = 1.200 \mu\text{l} \approx 1,20 \text{ ml}$). En la **Figura IV.22.B** se muestra la curva de amplificación de 1 ng de esta mezcla o *pool* (estándar de ADN de centeno).

Para cuantificar el ADN de centeno en muestras problema se emplearon curvas de calibrado elaboradas a partir de diluciones seriadas del estándar de ADN de centeno (**apartado III.3.3**). La **Figura IV.22.C** muestra las curvas de amplificación de una típica curva de calibrado: 10.000, 1.000, 100, 10 y 5 pg por reacción (equivalentes a 1.125, 112, 11,2, 1,12 y 0,56 genomas haploides por reacción).

Una vez terminada la reacción de amplificación, el programa *ABI PRISM® 7000 SDS v1.1* generó un gráfico de los logaritmos de las cantidades del estándar de ADN de centeno contra sus correspondientes valores de C_T . El resultado de la regresión lineal de estos puntos se muestra en el inserto de la **Figura IV.22.C**. El ajuste de los datos experimentales a la recta de regresión calculada fue muy bueno, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9998. La cuantificación de ADN de centeno en muestras problema se hizo interpolando en esta recta de regresión los valores de C_T obtenidos.

La pendiente de la recta de calibrado refleja la eficiencia del sistema. La pendiente de una recta de calibrado con una eficiencia del 100% tiene un valor (absoluto) de 3,322, que son los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. A medida que se pierde eficiencia, aumenta la pendiente y, por lo tanto, los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. Aplicando la fórmula $E (\%) = [10^{-(1/Pendiente)} - 1] \cdot 100$ (Watanabe et al., 1991), se calculó una eficiencia media del sistema de Q-PCR de centeno del 94,9%.

IV.6.3.3. Límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD)

Para calcular el límite de cuantificación (LOQ) del sistema desarrollado de Q-PCR de centeno, se amplificaron con dicho sistema cantidades decrecientes del estándar de ADN de centeno. Como zona o región de *cuantificación* se estableció aquella donde los logaritmos de las cantidades de ADN mostraban una buena correlación lineal con sus respectivos valores de C_T ($R^2 > 0,9900$) y con unas desviaciones estándar de los valores de C_T de los duplicados inferiores a 0,380 ciclos.

El sistema desarrollado de Q-PCR de centeno permite detectar y cuantificar contaminaciones de este cereal en un rango muy amplio (más de tres órdenes de magnitud). Se puede cuantificar hasta 5 pg de ADN de centeno (equivalente a 0,56 genomas haploides) por reacción (**Figura IV.22.C**). Sin embargo, también se detectaron contaminaciones por debajo de este LOQ. En este rango, conocido como zona o región de *detección*, no se pudieron calcular las medias de los duplicados de las muestras, puesto que se obtuvieron unas desviaciones estándar de los valores de C_T superiores a 0,380 ciclos (datos no mostrados).

Si en cada gen ribosomal 5S hay una copia de la secuencia diana y suponiendo que el sistema de Q-PCR_{Cn} pueda llegar a detectar hasta 1 copia por reacción, dicha gen ribosomal 5S estaría repetido unas 2 veces en cada genoma haploide del centeno.

El límite de detección (LOD) o sensibilidad del sistema se estableció analizando una harina de maíz negativa por ELISA-R5 y Q-PCR_{Cn} contaminada con cantidades conocidas de centeno (*Secale cereale*, variedades Merkator, Petkus y Macada) hasta unos niveles finales de prolaminas de 600, 57,5, 27, 12,5, 7,5, 4 y <1,5 ppm. Con el sistema desarrollado de Q-PCR de centeno se cuantificaron contaminaciones de este cereal en harinas de maíz con niveles de prolaminas entre las 600 y las 7,5 ppm (**Figura IV.23**). Gracias a la alta sensibilidad proporcionada por el fluoróforo SYBR[®] Green I, también se “detectaron” contaminaciones de centeno por debajo del LOQ (0,5 ng ADN_{Cn} por mg de muestra), como es el caso de una harina de maíz con 4 ppm de prolaminas (**Figura IV.23**).

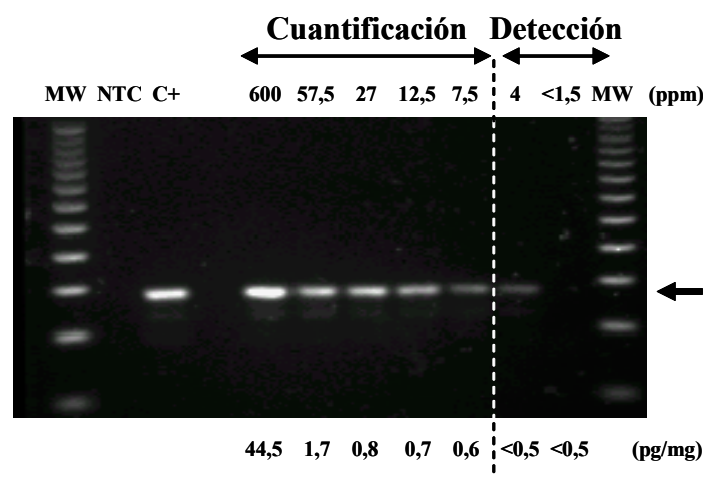


Figura IV.23 Electroforesis en gel de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR[®] Green I 1x de los productos de amplificación del sistema de Q-PCR de centeno de una harina de maíz contaminada con distintas cantidades de centeno (*Secale cereale*, variedades Merkator, Petkus y Macada). El contenido de prolaminas (ppm) se cuantificó con el ELISA-R5 Sandwich y los niveles de ADN (ng ADN_{Cn} / mg) se determinaron con el sistema optimizado de Q-PCR

de centeno. C+: Control positivo (100 pg del estándar de ADN de centeno). Con una flecha se señala el producto específico de amplificación (67 pb).

El *Codex Alimentarius* ha establecido unos límites de prolaminas para considerar un alimento apto o no para los enfermos celíacos que se encuentran entre las 10 y las 100 ppm. Aquellos alimentos que contiene menos de 10 ppm se consideran alimentos *libres de prolaminas*, y aquellos con un contenido entre 10-100 ppm se consideran alimentos elaborados aptos para el consumo de los enfermos celíacos. Por último, cantidades por encima de las 100 ppm se consideran demasiado altas. Por lo tanto, se puede concluir que la sensibilidad del sistema desarrollado de Q-PCR de centeno (aproximadamente 4 ppm de prolaminas) es adecuada para el análisis de alimentos “sin-gluten”, donde incluso pequeñas contaminaciones de estos cereales pueden generar graves problemas al colectivo celíaco.

IV.6.4. Sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno

IV.6.4.1. Especificidad del sistema

Para determinar la especificidad de los *primers* **WBR.F8** y **WBR.R8** se amplificaron con el sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno 1.000 pg de ADN purificado a partir de harinas de trigo (*Triticum spp*), triticale (*Triticosecale spp*), centeno (*Secale cereale*) y cebada (*Hordeum vulgare*), de cereales relacionados filogenéticamente, como la avena (*Avena sativa*), el maíz (*Zea mays*) o el arroz (*Oryza sativa*), y de otras especies vegetales distanciadas filogenéticamente, pero que son la base de muchos alimentos “sin-gluten”, como la soja (*Glycine max*), el alforfón (*Fagopyrum esculentum*) o el altramuz (*Lupinus albus*). Se utilizaron los mismos métodos de extracción, purificación y cuantificación de ADN que los empleados con las variedades de los estándares de ADN ([apartado III.3](#)). En la [Figura IV.24](#) se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación. Las harinas de trigo, centeno, cebada y triticale (híbrido entre el trigo y el centeno) dieron positivo, mientras que el resto de muestras no dieron ninguna señal. Los tamaños de los productos de amplificación eran tan similares (entre 78 y 81 pb) que mediante electroforesis en geles de agarosa no se obtuvo una separación lo suficientemente resuelta como para poder llegar a diferenciarlos entre si ([Figura IV.24](#)).

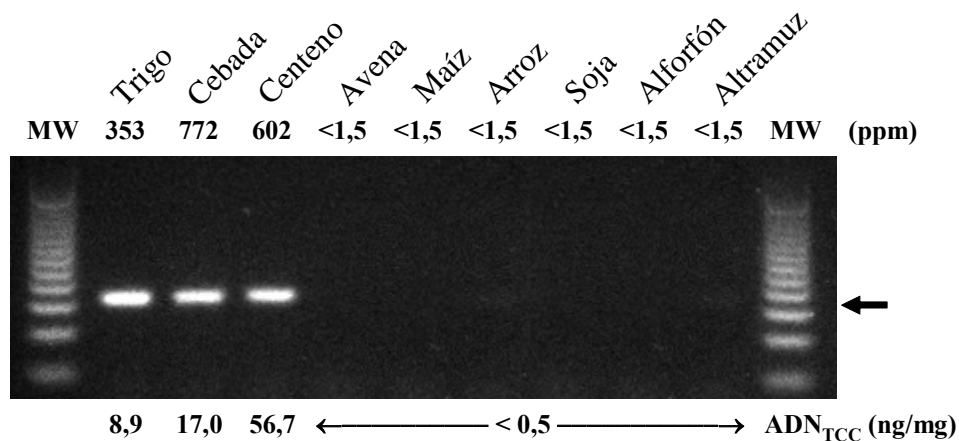


Figura IV.24 Electroforesis en geles de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR[®] Green I 1x de los productos de amplificación del sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno de controles positivos (harinas de trigo, cebada y centeno) y controles negativos (harinas de avena, maíz, arroz, soja, alforfón y altramuz). El contenido de prolaminas (ppm) se cuantificó con el ELISA-R5 Sandwich y los niveles de ADN (ng ADN_{TCC} / mg) se determinaron con el sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno. Con una flecha se señala los productos específicos de amplificación (entre 78 y 81 pb).

A continuación se generaron las curvas de disociación (o curvas de *melting*) de estos productos de amplificación (**Figura IV.25.A**). En estas gráficas se observó un único pico de disociación, que se corresponde con el producto específico de amplificación. No se observó ningún pico secundario debido a productos inespecíficos de amplificación o a dímeros de *primers*. El trigo y la cebada dieron una temperatura de *melting* (T_m) de 72,0°C, mientras que la T_m del centeno era 0,7°C más alta (72,7°C). Estas temperaturas coinciden aproximadamente con los valores teóricos de 71,0 y 72,0°C (respectivamente), calculados con el algoritmo del “vecino más próximo” (Breslauer *et al.*, 1986). El triticale, híbrido entre el trigo y el centeno, dio una T_m de 72,4°C (datos no mostrados), valor comprendido entre las T_m del trigo (72,0°C) y el centeno (72,7°C).

También se generaron las curvas de disociación de los productos de amplificación de varios *alimentos* contaminados con trigo, cebada y/o centeno (**Figura IV.25.B** y **Figura IV.25.C**). Se analizaron alimentos tan variados como masas fermentadas (de cebada y centeno), harinas de maíz, avenas y extractos proteicos (de guisante y altramuz). Por la T_m se pudo determinar si la contaminación procedía de trigo/cebada ($T_m = 72,0^\circ\text{C}$) o centeno ($T_m = 72,7^\circ\text{C}$).

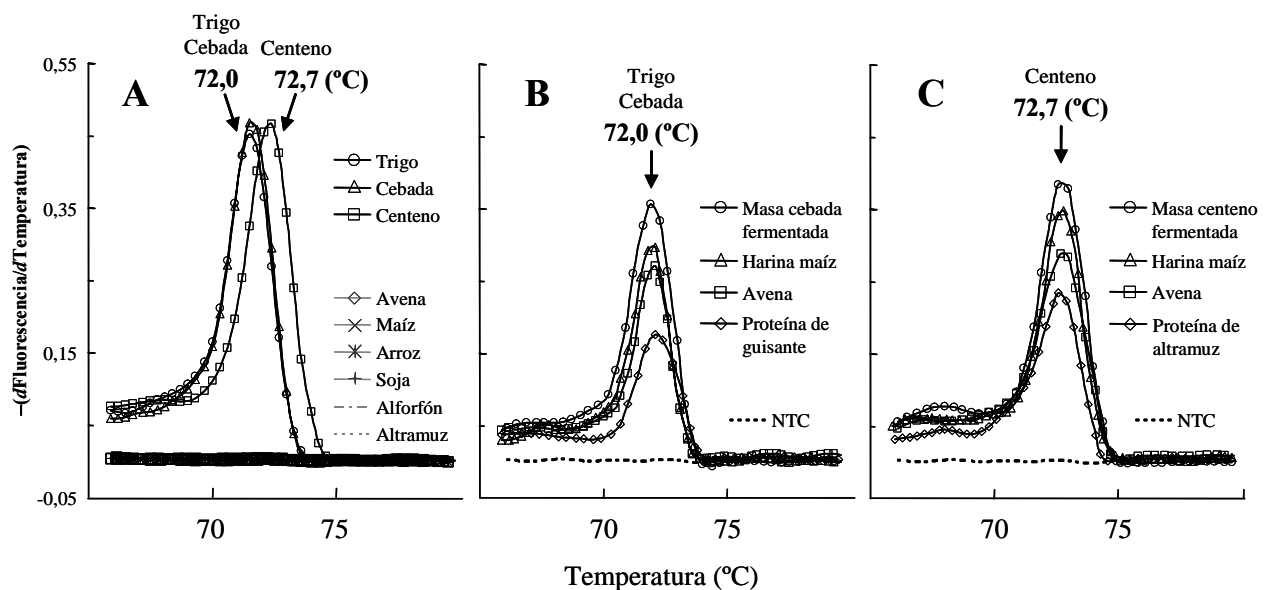


Figura IV.25 Curvas de disociación (o curvas de *melting*) de los productos de amplificación del sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno de (A) controles positivos (harinas de trigo, cebada y centeno) y controles negativos (harinas de avena, maíz, arroz, soja, alforfón y altramuz), (B) alimentos contaminados con trigo/cebada y (C) alimentos contaminados con solo centeno. Las flechas señalan la T_m (temperatura de *melting*, disociación o fusión) de los productos específicos de amplificación (72,0°C para el trigo/cebada y 72,7°C para el centeno).

Por último, para comprobar si los *primers* **WBR.F8** y **WBR.R8** detectaban tanto trigos duros como trigos blandos, se amplificaron con el sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno los extractos de ADN (dilución 1/50) de las harinas de tres variedades de *Triticum durum* (Regallo, Aldeano y Roqueño) y tres variedades de *Triticum aestivum* (Apuesto, Triana y Amón). Con todas ellas se obtuvo un producto de amplificación del tamaño y T_m esperados (datos no mostrados).

Se ha conseguido diseñar un par de *primers* que amplifican, con un alto nivel de *especificidad*, una secuencia del intrón del gen cloroplastidial *trnL* conservada en el trigo (tanto *Triticum durum* como *Triticum aestivum*), el centeno (*Secale cereale*), la cebada (*Hordeum vulgare*) y sus cruces, como por ejemplo, el triticale (híbrido entre el trigo y el centeno); y no manifiestan reactividad cruzada con otras especies (avena, maíz, arroz, soja, alforfón, atramuz...). Los productos de amplificación del trigo (80 pb), la cebada (81 pb) y el centeno (78 pb) co-migraron en la electroforesis en gel de agarosa, debido al bajo poder de resolución de este método analítico. Sin embargo, con las curvas de *melting* de los productos de amplificación se obtuvo una mayor resolución, llegando a diferenciar si la contaminación procedía de trigo/cebada ($T_m = 72,0^{\circ}C$) o centeno ($T_m = 72,7^{\circ}C$).

IV.6.4.2. Determinación del origen de la contaminación mediante la T_m

Con el objetivo de comprobar si a través de la temperatura de *melting*, disociación o fusión (T_m) de los productos de amplificación del sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno se podía discriminar el tipo de contaminación, se calcularon las T_m de las muestras de alimentos de la [Tabla IV.9](#) y la [Tabla IV.10](#). Todas ellas habían sido analizadas previamente con los sistemas individuales de Q-PCR de trigo, cebada y centeno, y se conocía exactamente la cantidad de ADN de cada uno de estos tres cereales.

En la [Figura IV.26](#) se representa la T_m de los productos de amplificación ($^{\circ}\text{C}$). Como se puede observar, las muestras contaminadas con trigo y/o cebada (0% centeno) dieron una T_m de $72,0^{\circ}\text{C}$, mientras que las muestras contaminadas con solo centeno (100% centeno) dieron una T_m de $72,7^{\circ}\text{C}$. Estos datos coinciden exactamente con los obtenidos al analizar las harinas de trigo, cebada y centeno utilizadas como controles de especificidad en el [apartado IV.6.4.1](#).

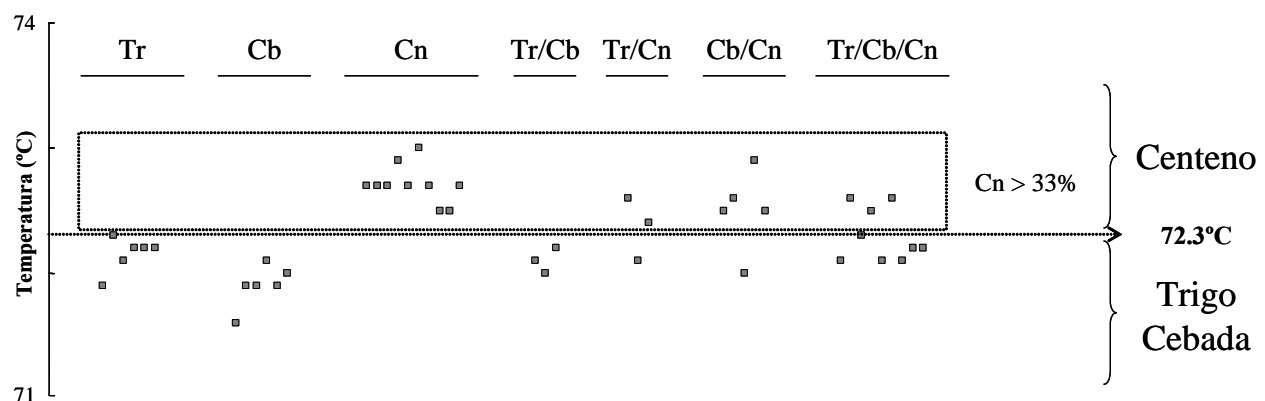


Figura IV.26 Temperaturas de *melting*, disociación o fusión (T_m) de los productos de amplificación del sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno de los alimentos de la [Tabla IV.9](#) y la [Tabla IV.10](#), contaminados con trigo (Tr), cebada (Cb), centeno (Cn) o con sus mezclas (Tr/Cb, Tr/Cn, Cb/Cn y Tr/Cb/Cn).

A partir de los resultados experimentales se pudo establecer una *línea umbral*. Aquellas muestras con un porcentaje de centeno inferior al 33% tenían una T_m por debajo de $72,3^{\circ}\text{C}$. Por otro lado, las muestras con un porcentaje de centeno superior al 33% tenían una T_m por encima de esta línea umbral ($72,3^{\circ}\text{C}$). Por lo tanto, se puede concluir que a partir de la temperatura de *melting* (T_m) de los productos de amplificación del sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno se puede determinar si un alimento está o no contaminado con centeno. Si la T_m está por encima de los $72,3^{\circ}\text{C}$, la muestra está contaminada con centeno en un porcentaje superior al 33% (respecto del total de ADN de trigo/cebada/centeno).

IV.6.4.3. Elaboración de la curva estándar de ADN de trigo/cebada/centeno

Para la preparación del estándar de trigo/cebada/centeno se utilizaron los estándares de ADN de trigo, cebada y centeno (siguiendo el protocolo del [apartado III.3](#)). Se amplificaron con el sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno 1.000 pg de los estándares de ADN de trigo (25 variedades), cebada (14 variedades) y centeno (4 variedades). Como se puede observar en la [Figura IV.27.A](#), las curvas de amplificación (*amplification plots*) obtenidas fueron muy similares [C_T (media \pm DE) = 23,58 \pm 0,20; n=6]. Por lo tanto, queda demostrado que el sistema desarrollado de Q-PCR es adecuado para cuantificar ADN de trigo, cebada y/o centeno en alimentos “sin-gluten” contaminados con especies desconocidas de estos tres cereales.

Puesto que los *primers* **WBR.F8** y **WBR.R8** hibridan de forma ligeramente distinta dependiendo de la especie utilizada, se decidió mezclar 300 μ l de las soluciones de 5 ng/ μ l de los estándares individuales de ADN de trigo, cebada y centeno (300 μ l x 3 = 900 μ l \equiv 0,90 ml). En la [Figura IV.27.B](#) se muestra la curva de amplificación de 1.000 pg de esta mezcla o *pool* (estándar de ADN de trigo/cebada/centeno).

Para cuantificar el ADN de trigo, cebada y/o centeno en muestras problema se emplearon curvas de calibrado elaboradas a partir de diluciones seriadas del estándar de ADN de trigo/cebada/centeno ([apartado III.3.3](#)). La [Figura IV.27.C](#) muestra las curvas de amplificación de una típica curva de calibrado: 10.000, 1.000, 100, 10 y 5 pg por reacción.

Una vez terminada la reacción de amplificación, el programa *ABI PRISM® 7000 SDS v1.1* generó un gráfico de los logaritmos de las cantidades del estándar de ADN de trigo/cebada/centeno contra sus correspondientes valores de C_T . El resultado de la regresión lineal de estos puntos se muestra en el inserto de la [Figura IV.27.C](#). El ajuste de los datos experimentales a la recta de regresión calculada fue muy bueno, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9997. La cuantificación de ADN de trigo, cebada y/o centeno en muestras problema se hizo interpolando en esta recta de regresión los valores de C_T obtenidos.

La pendiente de la recta de calibrado refleja la eficiencia del sistema. La pendiente de una recta de calibrado con una eficiencia del 100% tiene un valor (absoluto) de 3,322, que son los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. A medida que se pierde eficiencia, aumenta la pendiente y, por lo tanto, los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. Aplicando la fórmula $E (\%) = [10^{-(1/P_{\text{pendiente}})} - 1] \cdot 100$ (Watanabe et al., 1991), se calculó una eficiencia media del sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno del 98,7%.

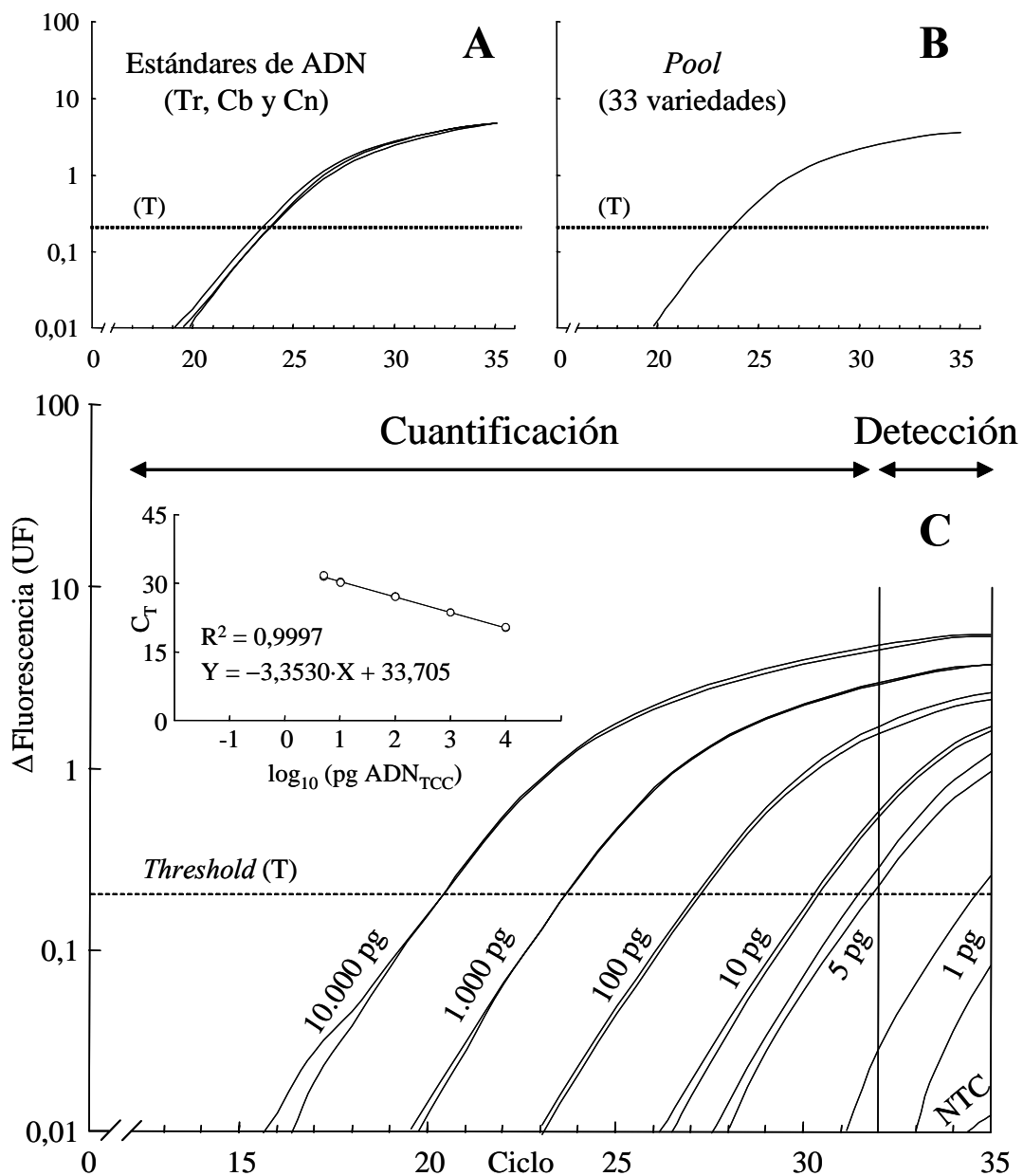


Figura IV.27 (A) Curvas de amplificación de 1.000 pg de los estándares de ADN de trigo (25 variedades), cebada (14 variedades) y centeno (4 variedades) y (B) de su mezcla o pool (estándar de ADN de trigo/cebada/centeno elaborado a partir de 43 variedades) (C) Curva estándar de cantidades conocidas del estándar de ADN de trigo/cebada/centeno. En la figura se resaltan dos zonas o regiones: una de cuantificación, que va desde 10.000 hasta 5 pg, y otra de detección, por debajo de los 5 pg. En todos los experimentos se fijó la línea del umbral de detección o *threshold* (T) en 0,2 UF.

IV.6.4.4. Límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD)

Para calcular el límite de cuantificación (LOQ) del sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno, se amplificaron con dicho sistema cantidades decrecientes del estándar de ADN de trigo/cebada/centeno. Como zona o región de *cuantificación* se estableció aquella donde los logaritmos de las cantidades de ADN mostraban una buena correlación lineal con sus respectivos valores de C_T ($R^2 > 0,9900$) y con unas desviaciones estándar de los valores de C_T de los duplicados inferiores a 0,380 ciclos.

El sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno permite detectar y cuantificar contaminaciones de estos tres cereales en un rango muy amplio (más de tres órdenes de magnitud). Se puede cuantificar hasta 5 pg de ADN_{TCC} por reacción (**Figura IV.27.C**), equivalente a 0,5 ng de ADN_{TCC} por mg de muestra. Sin embargo, también se detectaron contaminaciones por debajo de este LOQ. En este rango, conocido como zona o región de *detección*, no se pudieron calcular las medias de los duplicados de las muestras, puesto que se obtuvieron unas desviaciones estándar de los valores de C_T superiores a 0,380 ciclos (**Figura IV.27.C**).

El límite de detección (LOD) o sensibilidad del sistema se estableció analizando una harina de maíz negativa por ELISA-R5 y Q-PCR_{TCC} contaminada con cantidades conocidas de trigo (*Triticum durum*, variedad Araldun), cebada (*Hordeum vulgare*, variedad Alpha) y centeno (*Secale cereale*, variedades Merkator y Petkus), hasta unos niveles finales de prolaminas entre 750 y <1,5 ppm. Como se puede observar en la **Figura IV.28** los productos de amplificación del trigo, la cebada y el centeno (de 80, 81 y 78 pb, respectivamente) co-migraron en la electroforesis en gel de agarosa, debido al bajo poder de resolución de este método analítico. El LOQ del sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno (0,5 ng ADN_{TCC} por mg de muestra) se corresponde con unos niveles de prolaminas entre 10 y 5,3 ppm (**Figura IV.28**). Sin embargo, también se detectaron contaminaciones de trigo, cebada y centeno por debajo de este LOQ, en aquellas harinas de maíz con niveles de prolaminas entre 4,5 y 2,5 ppm (**Figura IV.28**).

También se determinó un LOD similar en muestras de *alimentos no tratados con calor*. Con el sistema simultáneo de Q-PCR_{TCC} se cuantificaron contaminaciones de trigo, cebada y centeno en alimentos con niveles de prolaminas entre las 129 y las 22 ppm (**Figura IV.29.A**). Gracias a la alta sensibilidad proporcionada por el fluoróforo SYBR[®] Green I, también se “detectaron” contaminaciones de estos tres cereales por debajo del LOQ, entre las 22 y las 10 ppm de prolaminas (**Figura IV.29.A**).

El *Codex Alimentarius* ha establecido unos límites de prolaminas para considerar un alimento apto o no para los enfermos celíacos que se encuentran entre las 10 y las 100 ppm. Aquellos alimentos que contiene menos de 10 ppm se consideran alimentos *libres de prolaminas*, y aquellos con un contenido entre 10-100 ppm se consideran alimentos elaborados aptos para el consumo de los enfermos celíacos. Por último, cantidades por encima de las 100 ppm se consideran demasiado altas. Por lo tanto, se puede concluir que la sensibilidad del sistema simultáneo de Q-PCR_{TCC} (entre 10 y 2,5 ppm de prolaminas) es adecuada para el análisis de alimentos “sin-gluten”, donde incluso pequeñas contaminaciones de trigo, cebada y/o centeno pueden generar graves problemas al colectivo celíaco.

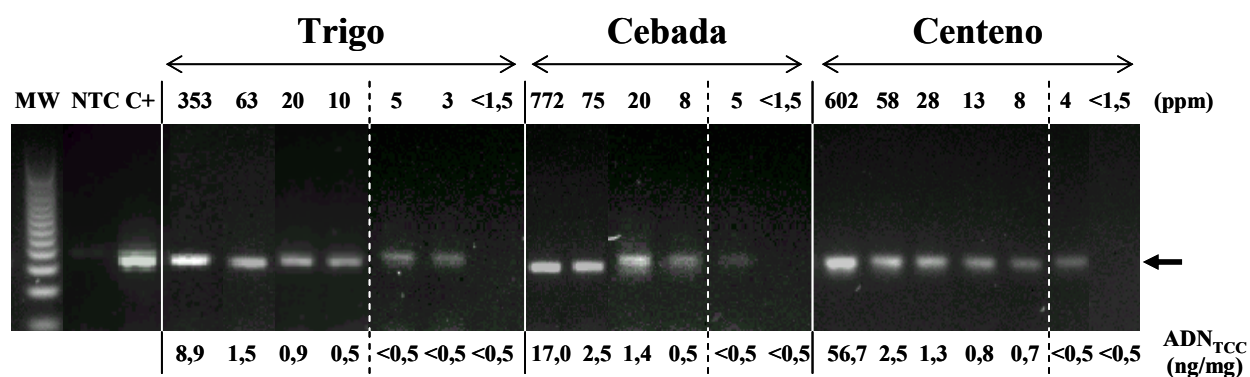


Figura IV.28 Electroforesis en geles de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR[®] Green I 1x de los productos de amplificación del sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno de una harina de maíz contaminada con distintas cantidades de trigo (*Triticum durum*, variedad Araldum), cebada (*Hordeum vulgare*, variedad Alpha) y centeno (*Secale cereale*, variedades Merkator y Petkus). El contenido de prolaminas (ppm) se cuantificó con el ELISA-R5 Sandwich y los niveles de ADN (ng ADN_{TCC} / mg) se determinaron con el sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno. C+: Control positivo (100 pg del estándar de ADN_{TCC}). Con una flecha se señala los productos específicos de amplificación (entre 78 y 81 pb).

IV.6.4.5. Reproducibilidad

A continuación se realizó un estudio de reproducibilidad para todo el procedimiento (extracción de los ácidos nucleicos con el método *Wizard*[®] sin fase de purificación y cuantificación del ADN de trigo, cebada y/o centeno con el sistema simultáneo de Q-PCR). Se utilizó la misma harina de avena seleccionada para los estudios de reproducibilidad de los sistemas individuales de Q-PCR (contaminada con 195 ppm de prolaminas). Se obtuvo un coeficiente de variación del 14,45% para cinco extractos analizados por duplicado en cinco días distintos (n=10) con sus respectivas curvas estándar [todas ellas con coeficientes de correlación (R^2) por encima de 0,9900 y con eficiencias superiores al 90%]. Este coeficiente de variación es muy similar a los obtenidos con los sistemas individuales de Q-PCR de trigo y cebada (11,01% y 11,92%, respectivamente). Son

unos resultados muy buenos, si se tiene en cuenta que los métodos actuales basados en la Q-PCR proporcionan coeficientes de variación que van desde 17,3 hasta 26,0% en la cuantificación de 1% de maíz y soja transgénica (Hubner *et al.*, 2001; Brodmann *et al.*, 2002; Höhne *et al.*, 2002; Pardigol *et al.*, 2003).

IV.6.4.6. Correlación entre los niveles de prolaminas y ADN de trigo, cebada y centeno

IV.6.4.6.1. Harinas y alimentos no tratados con calor

En este estudio se analizaron un total de 50 muestras *no tratadas con calor*. Se seleccionaron 24 harinas de maíz negativas por ELISA-R5 y Q-PCR_{TCC}, contaminadas con cantidades conocidas de trigo (*Triticum durum*, variedad Araldun), cebada (*Hordeum vulgare*, variedad Alpha), centeno (*Secale cereale*, variedades Merkator y Petkus) y sus mezclas (Tr/Cb, Tr/Cn, Cb/Cn y Tr/Cb/Cn). Algunas de estas harinas de maíz eran las mismas que se utilizaron para el cálculo del límite de detección (LOD) en el apartado IV.6.4.4 (muestras de la Figura IV.29.A). También se seleccionaron 26 muestras de alimentos no tratados con calor, como harinas de alforfón, maíz, arroz, avena y soja, almidones, masas fermentadas y extractos proteicos de altramuz.

Los niveles de prolaminas, expresados en ppm, fueron cuantificados con el método de ELISA-R5 Sándwich. Las contaminaciones iban desde las 8 ppm de un par de harinas de maíz contaminadas con cebada y centeno (variedades Alpha y Petkus, respectivamente), hasta las 59.444 ppm de una masa de cebada fermentada. Estas muestras también fueron analizadas con el sistema simultáneo de Q-PCR_{TCC}. En la Figura IV.29.A se representa los niveles de ADN (ng ADN_{TCC} / mg) frente al contenido de prolaminas (ppm). Como se puede observar, en las 50 muestras no tratadas con calor seleccionadas para este estudio, existe una buena correlación lineal entre los datos de prolaminas y ADN_{TCC} ($R^2=0,9325$).

Esta es la primera vez que se contrasta la información proporcionada por un método inmunológico de cuantificación de prolaminas (ELISA-R5 Sándwich) con un sistema de cuantificación simultánea de ADN de trigo, cebada y centeno basado en la tecnología de la PCR cuantitativa en tiempo-real (Q-PCR) y en el fluoróforo SYBR[®] Green I. Se ha observado una buena correlación lineal entre los datos de prolaminas (método inmunológico) y los de ADN_{TCC} (método no inmunológico). Por lo tanto, se puede concluir que el sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno se puede utilizar como técnica no inmunológica complementaria al ELISA-R5 Sándwich en el análisis de alimentos “sin-gluten”.

IV.6.4.6.2. Alimentos tratados con calor

Una gran parte de los alimentos “sin-gluten” son sometidos durante su procesamiento a altas temperaturas. Fue necesario conocer si el sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno era capaz de detectar ADN en este tipo de muestras. En este sentido se seleccionaron 19 muestras de alimentos tratados con calor: alimentos de soja, avena, maíz y otro tipo de alimentos elaborados (como panes, potitos y alimentos infantiles). Para la extracción de las prolaminas de estas muestras se utilizó el “*Cocktail Solution*” ([apartados I.2.1 y III.7.2.2](#)).

Los niveles de prolaminas, expresados en ppm, fueron cuantificados con el método de ELISA-R5 Sándwich. Las contaminaciones iban desde las 19 ppm de un salvado de soja, hasta las 178 ppm de una harina de maíz tostada. Estas muestras también fueron analizadas con el sistema simultáneo de Q-PCR_{TCC}. En la [Figura IV.29.B](#) se representa los niveles de ADN (ng ADN_{TCC} / mg) frente al contenido de prolaminas (ppm). Como se puede observar, todas las muestras dieron positivo con el sistema simultáneo de Q-PCR_{TCC}. Sin embargo, en este caso (*alimentos procesados con calor*), no se observó correlación lineal entre los datos de prolaminas y de ADN_{TCC} [coeficiente de correlación (R^2) por debajo de 0,9]. Durante el tratamiento térmico el ADN puede haberse degradado y/o fragmentado de tal forma que la correlación entre el ADN_{TCC} y las prolaminas se haya visto alterada. Sin embargo, parte de los fragmentos que quedaron eran lo suficientemente grandes como para poder ser detectados por los *primers* del sistema simultáneo de Q-PCR_{TCC}.

Gracias al pequeño tamaño de los productos de amplificación (entre 78 y 81 pb), el sistema simultáneo de Q-PCR es capaz de detectar contaminaciones de trigo, cebada y centeno incluso en alimentos tratados con calor, donde las moléculas de ADN suelen estar parcialmente degradadas y/o fragmentadas. Sin embargo, en este grupo de alimentos la correlación entre los datos de prolaminas y ADN_{TCC} no es del todo lineal.

En el [apartado IV.8](#) se hace un estudio más profundo y detallado sobre el efecto del calor en el contenido de prolaminas y ADN.

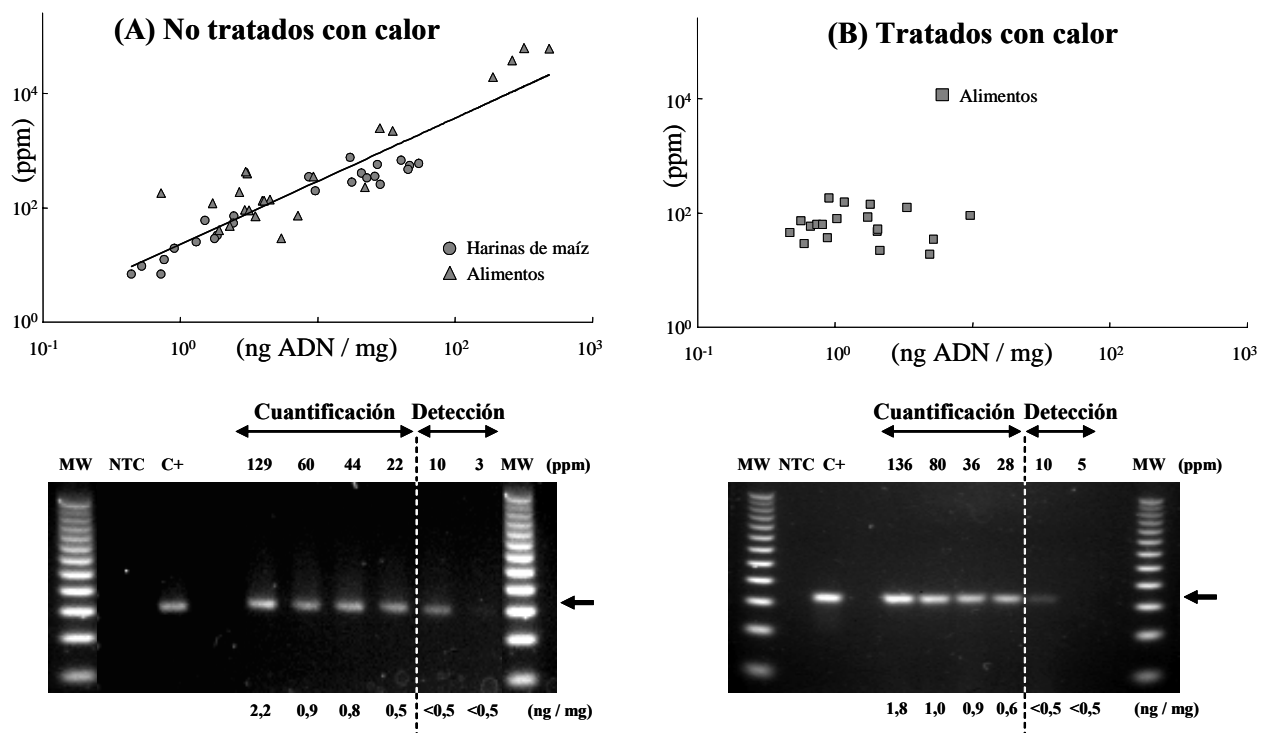


Figura IV.29 Análisis de (A) alimentos no tratados con calor y (B) tratados con calor, contaminados con trigo, cebada y/o centeno. (Arriba) Correlación entre los datos de ELISA-R5 Sándwich (ppm de prolaminas) y el sistema simultáneo de Q-PCR (ng ADN_{TCC} / mg). En las muestras no tratadas con calor se ha representado la recta de regresión calculada a partir de los datos experimentales ($R^2=0,9325$). Tanto el eje de ordenadas como el eje de abscisas están en escala logarítmica. (Abajo) Electroforesis en geles de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR® Green I 1x de los productos de amplificación del sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno. C+: Control positivo (100 pg del estándar de ADN de trigo/cebada/centeno). Con una flecha se señala los productos específicos de amplificación (entre 78 y 81 pb).

IV.6.5. Estudio comparativo entre los sistemas individuales (Q-PCR_{Tr}, Q-PCR_{Cb} y Q-PCR_{Cn}) y el sistema simultáneo (Q-PCR_{TCC}) de cuantificación de ADN de trigo, cebada y centeno

Una vez desarrollados y optimizados los cuatro sistemas de Q-PCR, se hizo un estudio comparativo entre los valores de ADN de trigo, cebada y centeno (pg ADN_{TCC} / mg) cuantificados con los sistemas individuales (Q-PCR_{Tr} + Q-PCR_{Cb} + Q-PCR_{Cn}) o con el sistema simultáneo (Q-PCR_{TCC}).

Al principio se analizaron muestras de alimentos contaminadas con solo trigo, solo cebada o solo centeno (**Tabla IV.9**). Como se puede observar en esta tabla, existe una buena correlación entre el sistema individual y el sistema simultáneo (entre un 70 y un 153%). Estos porcentajes están calculados dividiendo la cantidad de ADN calculada con el sistema individual (Q-PCR_{Tr}, Q-PCR_{Cb} o Q-PCR_{Cn}) entre la cantidad de ADN calculada con el sistema simultáneo (Q-PCR_{TCC}), y multiplicado este número por cien. Estos resultados son muy buenos si se tiene en cuenta que las reproducibilidades de los métodos desarrollados rondan entre el 11,01 y el 14,45% de coeficiente de variación.

Tabla IV.9 Comparación entre los sistemas individuales (Q-PCR_{Tr}, Q-PCR_{Cb} y Q-PCR_{Cn}) y el simultáneo (Q-PCR_{TCC}) en el análisis de alimentos contaminados con un solo tipo de cereal: trigo (Tr), cebada (Cb) o centeno (Cn).

Cereal contaminante	Q-PCR_{Tr}	Q-PCR_{Cb}	Q-PCR_{Cn}	Q-PCR_{TCC}	(%)
Tr	13.701	-	-	8.950	(153)
Tr	2.363	-	-	1.550	(152)
Tr	846	-	-	920	(92)
Cb	-	445.170	-	335.360	(133)
Cb	-	478.437	-	513.600	(93)
Cb	-	16.102	-	22.894	(70)
Cb	-	1.000	-	736	(136)
Cn	-	-	211.623	274.500	(77)
Cn	-	-	166.710	197.500	(84)
Cn	-	-	2.551	3.146	(81)
Cn	-	-	27.310	27.170	(101)
Cn	-	-	22.874	29.609	(77)
Cn	-	-	2.174	2.505	(87)
Cn	-	-	1.980	1.826	(108)
Cn	-	-	1.212	1.340	(90)
Cn	-	-	716	734	(98)

Entre paréntesis se indican los porcentajes (%) de la cantidad de ADN calculada con el sistema individual respecto de la cantidad de ADN calculada con el sistema simultáneo. Los valores están expresados en pg ADN / mg.

También se analizaron muestras de alimentos contaminados con mezclas de trigo, cebada y/o centeno (**Tabla IV.10**). En estos casos, los tres sistemas individuales de Q-PCR fueron necesarios. También se observó una buena correlación entre los sistemas individuales y el sistema simultáneo (entre un 83 y un 146%). En estos casos, los porcentajes de

correspondencia están calculados dividiendo la cantidad total de ADN calculada con los sistemas individuales ($Q\text{-PCR}_{\text{Tr}} + Q\text{-PCR}_{\text{Cb}} + Q\text{-PCR}_{\text{Cn}}$) entre la cantidad de ADN calculada con el sistema simultáneo ($Q\text{-PCR}_{\text{TCC}}$), y multiplicado este número por cien.

Tabla IV.10 Comparación entre los sistemas individuales ($Q\text{-PCR}_{\text{Tr}}$, $Q\text{-PCR}_{\text{Cb}}$ y $Q\text{-PCR}_{\text{Cn}}$) y el simultáneo ($Q\text{-PCR}_{\text{TCC}}$) en el análisis de alimentos contaminados con mezclas de trigo (Tr), cebada (Cb) y/o centeno (Cn).

Mezcla de cereales	$Q\text{-PCR}_{\text{Tr}}$	$Q\text{-PCR}_{\text{Cb}}$	$Q\text{-PCR}_{\text{Cn}}$	$Q\text{-PCR}_{\text{TCC}}$	(%)
Tr / Cb	9533	40854	-	48971	(103)
Tr / Cb	949	2670	-	3248	(111)
Tr / Cb	1331	1038	-	2342	(101)
Tr / Cn	12624	-	30446	47463	(91)
Tr / Cn	12316	-	1493	9942	(139)
Tr / Cn	1114	-	897	2059	(98)
Cb / Cn	-	37071	24876	42373	(146)
Cb / Cn	-	21509	6852	21592	(131)
Cb / Cn	-	2822	20737	23768	(99)
Cb / Cn	-	1016	757	2057	(86)
Tr / Cb / Cn	1945	29008	872	29577	(108)
Tr / Cb / Cn	3878	5352	26816	36626	(98)
Tr / Cb / Cn	10573	15269	14212	28394	(141)
Tr / Cb / Cn	64	756	1740	3070	(83)
Tr / Cb / Cn	4075	3999	2048	9622	(105)
Tr / Cb / Cn	1123	9828	6806	18400	(97)
Tr / Cb / Cn	573	1390	1025	2766	(108)
Tr / Cb / Cn	425	3853	1134	4169	(130)

Entre paréntesis se indican los porcentajes (%) de la cantidad de ADN calculada a partir de la suma de los tres sistemas individuales respecto de la cantidad de ADN calculada con el sistema simultáneo. Los valores están expresados en pg ADN / mg.

Los sistemas individuales de Q-PCR de trigo, cebada y centeno son útiles para analizar muestras de alimentos contaminados con un solo tipo de cereal. Sin embargo, subestiman el contenido de ADN en aquellas muestras de alimentos que contienen una mezcla de estos tres cereales. En la práctica, cuando se analizan muestras de alimentos, no se conoce la procedencia de la contaminación (si es de trigo, de cebada, de centeno o de sus mezclas). Por lo tanto, siempre va a ser necesario el uso de los tres sistemas individuales.

El sistema simultáneo de Q-PCR podría llegar a sustituir a los tres sistemas individuales. Este sistema utiliza un único par de *primers* capaces de detectar y cuantificar, en una única reacción de Q-PCR, contaminaciones de trigo, cebada y/o centeno en alimentos, con el correspondiente ahorro de tiempo y dinero. Sin embargo, con el sistema simultáneo de Q-PCR no se puede calcular el porcentaje de contaminación de cada cereal. Por lo tanto, los sistemas individuales de Q-PCR proporcionan más información, al cuantificar por separado las cantidades de ADN de trigo, cebada y centeno.

IV.7. ANÁLISIS DE ALIMENTOS

La Unidad de Gluten del Centro Nacional de Biotecnología dispone de una *alimentoteca* con más de 12.000 *muestras* de alimentos, que han sido analizadas por ELISA, *Western Blot* y Espectrometría de Masas MALDI-TOF. En la **Figura IV.30** aparecen las electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación de **64 muestras** analizadas con el sistema individual de Q-PCR de trigo (pg ADN_{Tr} / mg). En la misma figura también aparecen los niveles de prolaminas (ppm), cuantificados con el método de ELISA-R5 Sándwich. Por lo general, todas las muestras positivas por ELISA-R5 Sándwich también dieron positivo por el sistema individual de Q-PCR de trigo (**Figura IV.30**).

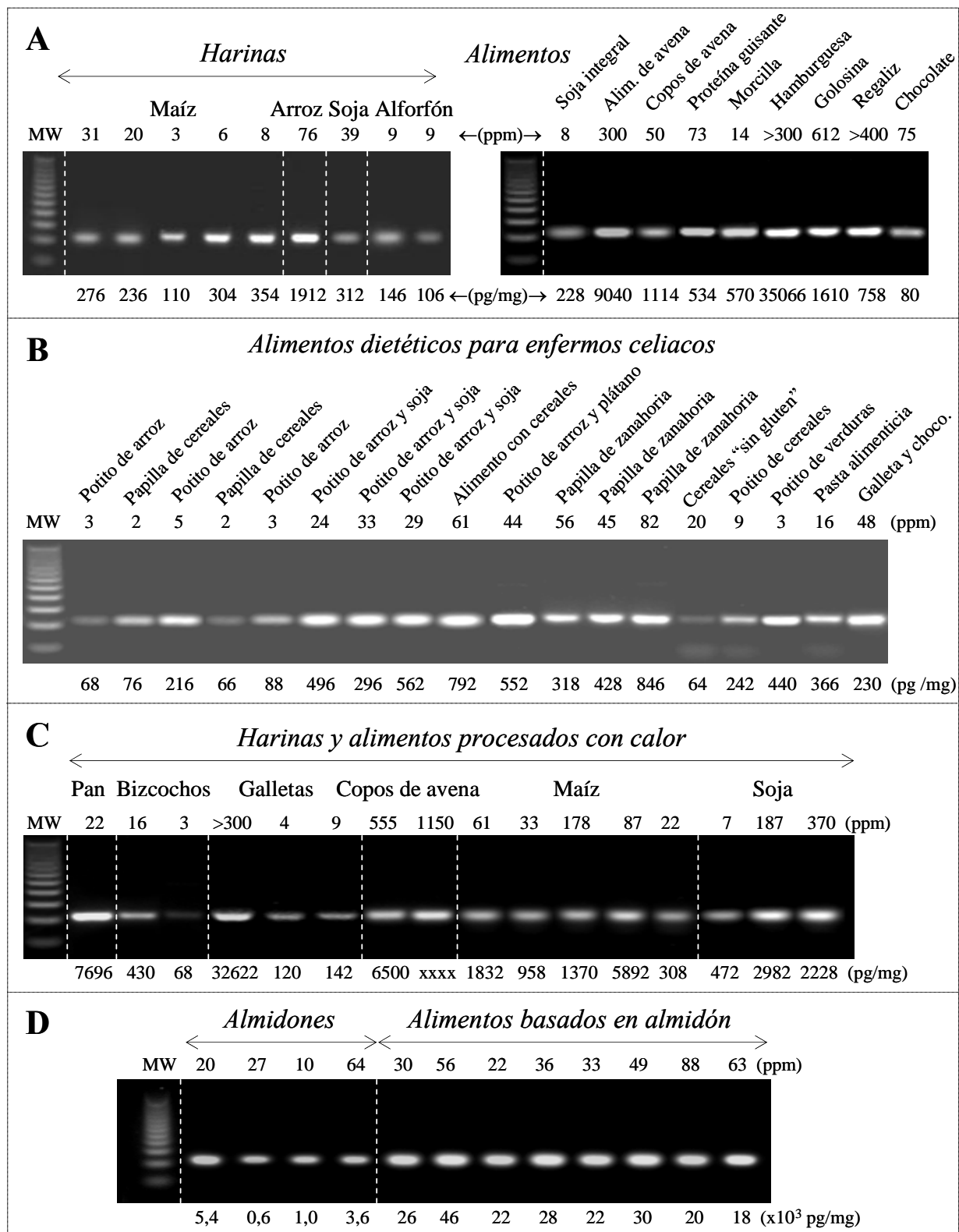


Figura IV.30 Electroforesis en gels de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR® Green I 1x de los productos de amplificación del sistema de Q-PCR de trigo obtenidos al analizar (A) harinas y alimentos varios, (B) alimentos dietéticos para enfermos celiacos, (C) harinas y alimentos procesados con calor y (D) basados en almidón de trigo. El contenido de prolaminas de las muestras (ppm) se cuantificó con el ELISA-R5 Sandwich y los niveles de ADN (pg ADN_{Tr} / mg) se determinaron con el sistema optimizado de Q-PCR de trigo.

IV.7.1. Alimentos dietéticos para enfermos celíacos

Se analizaron 18 alimentos dietéticos para enfermos celíacos, etiquetados como “sin-gluten” o “libre de gluten”. A pesar de ello, estaban contaminados con prolaminas, aunque a unos niveles muy bajos (inferiores a 100 ppm). Como se puede apreciar en la electroforesis en gel de agarosa de la [Figura IV.30.B](#), en todas las muestras se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado (51 pb) y unos valores de ADN de trigo por encima del límite de cuantificación ($> 20 \text{ pg ADN}_{\text{Tr}} / \text{mg}$).

IV.7.2. Harinas y alimentos tratados con calor

Una gran parte de los alimentos “sin-gluten” son sometidos durante su procesamiento a altas temperaturas. Fue necesario conocer si el sistema de Q-PCR de trigo era capaz de detectar ADN en este tipo de muestras. En este sentido se analizaron varias harinas y otros alimentos tratados con calor, como panes, bizcochos, galletas, copos de avena... ([Figura IV.30.C](#)). Para la extracción de las prolaminas de estos alimentos se utilizó el “*Cocktail Solution*” ([apartados I.2.1](#) y [III.7.2.2](#)). Como se puede observar en la [Figura IV.30.C](#), todas las muestras contaminadas con prolaminas dieron positivo con el sistema de Q-PCR de trigo. Por lo tanto, aunque el ADN puede haberse fragmentado en trozos pequeños durante el tratamiento térmico, esto no afecta a su posterior detección.

La posible limitación de la técnica de Q-PCR debido a la degradación del ADN durante el procesado de los alimentos a altas temperaturas se puede superar diseñando *primers* que amplifiquen fragmentos pequeños de ADN (entre 50 y 100 pb). Esta misma estrategia ha sido empleada por otros autores (Terzi *et al.*, 2003) obteniendo también muy buenos resultados.

En el [apartado IV.8](#) se hace un estudio más profundo y detallado sobre el efecto del calor en el contenido de prolaminas y ADN.

IV.7.3. Alimentos basados en almidón de trigo

En el caso de los alimentos basados en almidón de trigo, la relación entre la cantidad de ADN de trigo y prolaminas es anormalmente alta ([Figura IV.30.D](#)). El proceso industrial de extracción del almidón podría explicar este hecho:

«Los granos de trigo son remojados en una solución acuosa con bisulfito sódico, ácido láctico y una serie de enzimas (entre ellas, β -glucanasa fúngica). Los granos remojados se muelen en una licuadora y la fracción fibra-germen se separa mediante tamizado y lavado. Entonces el almidón se separan las prolaminas mediante centrifugación (las prolaminas tiene menor densidad que el almidón). Posteriormente se seca el almidón a 50°C durante 24 h.»

Como se puede observar, durante el proceso industrial de elaboración del almidón, éste se separa de las prolaminas, lo que podría explicar el aumento de la cantidad de ADN de trigo en relación con el contenido de prolaminas.

IV.7.4. Alimentos de avena

Con los sistemas individuales de Q-PCR_{Tr} y Q-PCR_{Cb} se cuantificaron los niveles de ADN de trigo y cebada de las 47 muestras de avena enviadas por el Dr. Markku Mäki desde Finlandia ([apartado III.1.4](#)). También se cuantificaron –en dos laboratorios independientes– los niveles de prolaminas con el método de ELISA-R5 Sándwich: en *Arla Foods Innovation* (Brabrand, Dinamarca) y en la *Unidad de Gluten* (Madrid, España). En la [Tabla IV.11](#) y en la [Figura IV.31](#) aparecen estas muestras de avena ordenadas de menor a mayor contenido en ADN de trigo y cebada, y también se recogen todos los resultados de este estudio.

De las 47 muestras de avena, sólo 2 (4,3%) dieron negativo por el método de ELISA-R5 Sándwich (niveles de prolaminas por debajo de 1,5 ppm). Una de ellas (#1) también dio negativo por ambos sistemas de Q-PCR. Sin embargo, la otra muestra de avena (#5) estaba contaminada con 164 pg ADN_{Tr} / mg. Esto puede ser explicado por una mayor sensibilidad del sistema de Q-PCR_{Tr} ([apartado IV.6.1.4](#)). Las 45 muestras de avena restantes (95,7%) estaban contaminadas con distintos niveles de prolaminas: 10,6% con menos de 100 ppm, 61,7% entre 100 y 1.000 ppm, y 23,4% con más de 1.000 ppm. Todas las muestras de avena positivas por ELISA-R5 Sándwich también dieron positivo con alguno de los dos sistemas de Q-PCR, excepto las muestras #2, #3 y #4, que a pesar de estar contaminadas con distintos niveles de prolaminas (82, 139 y 467 ppm, respectivamente), dieron negativo con los sistemas individuales de Q-PCR de trigo y cebada ([Tabla IV.11](#)). O bien, estas muestras estaban contaminadas con centeno, o durante el procesado industrial el ADN pudo haberse degradado y/o fragmentado en trozos tan pequeños que no pudieron ser amplificados por ninguno de los dos sistemas desarrollados de Q-PCR.

Como se puede observar en la **Tabla IV.11**, la mayoría de las muestras de avena (78,7%) dieron unos coeficientes de variación (CV) para la cuantificación de prolaminas iguales o inferiores al 30% en dos laboratorios distintos (n=2). Solo 10 de las 47 muestras (21,3%) superaron el 30% de CV (#6, #7, #9, #15, #18, #22, #23, #27, #31 y #41). Esto podría ser explicado por una mala molienda de las muestras analizadas, puesto que la homogeneidad de las muestras afecta a la reproducibilidad de los métodos de análisis: cuanto más homogénea sea una muestra, menores serán las diferencias entre los replicados (CV más bajos).

Tabla IV.11 Análisis de 47 alimentos de avena mediante ELISA-R5 Sándwich (ppm de prolaminas) y los sistemas individuales de Q-PCR de trigo y cebada (pg ADN / mg).

N	ELISA-R5	Q-PCR		N	ELISA-R5	Q-PCR	
	Prolaminas (ppm)	Trigo (pg/mg)	Cebada (pg/mg)		Prolaminas (ppm)	Trigo (pg/mg)	Cebada (pg/mg)
1	< 1,5	<20	<100	25	380	182	4823
2	82	<20	<100	26	236	542	4642
3	139	<20	<100	27	132	1443	4354
4	467	<20	<100	28	784	860	5594
5	< 1,5	164	<100	29	709	3472	3695
6	93	236	<100	30	1019	706	7905
7	1192	<20	348	31	721	5768	2848
8	52	<20	534	32	1269	316	8993
9	337	26	756	33	755	166	9474
10	110	38	1150	34	279	44	10000
11	204	<20	1520	35	4645	292	10974
12	23	<20	1593	36	601	594	10844
13	232	241	1803	37	1191	4080	8856
14	206	96	1999	38	344	114	15955
15	181	466	1650	39	195	<20	16913
16	357	30	2277	40	856	3008	14207
17	98	<20	2632	41	210	175	19358
18	563	444	2303	42	1703	6146	14729
19	1393	2180	656	43	1182	4524	18659
20	180	96	3275	44	809	140	27909
21	400	2529	949	45	1802	648	29092
22	340	46	3511	46	3802	1962	40616
23	278	2112	2015	47	2438	795	70618
24	396	1022	3448				

Cuando Valdés y colaboradores analizaron con el método de ELISA-R5 Sandwich alimentos “sin-gluten”, o alimentos elaborados a partir de arroz o maíz, sólo el 6% (n=3.008), 5% (n=742) y 19% (n=322) de las muestras analizadas, respectivamente, dieron niveles de prolaminas por encima de las 100 ppm. Sin embargo, este porcentaje se disparó hasta el 56% en el caso de los alimentos de avena (n=187). Por otro lado, mientras que los niveles de prolaminas de los alimentos “sin-gluten” no excedían de las 350-400 ppm, en el caso de los alimentos de avena se llegaron a alcanzar hasta las 7.500 ppm (Valdes *et al.*, 2003). En esta Tesis Doctoral se han obtenido unos resultados similares: el 85% de las muestras de avena analizadas (n=47) han dado unos niveles de prolaminas por encima de las 100 ppm (cantidades consideradas demasiado altas por el *Codex Alimentarius* y, por lo tanto, perjudiciales para el colectivo celiaco), llegando a alcanzar hasta las 4.645 ppm (#35).

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos con el método de ELISA-R5 Sándwich y descartar una posible reacción cruzada del anticuerpo monoclonal R5 (AcM R5) con las prolaminas de las avenas (*aveninas*), se utilizaron otras técnicas complementarias. Las técnicas basadas en el AcM R5 (técnicas inmunológicas como el ELISA o el *Western Blot*) detectan simultáneamente gliadinas, hordeínas y secalinas, pero no son capaces de distinguir si la contaminación procede del trigo, la cebada y/o el centeno. Sin embargo, con los sistemas individuales de Q-PCR se pudo determinar origen y el grado de la contaminación. Sólo 4 de las 47 muestras de avena (8,5%) dieron negativo por ambos sistemas (#1–#4). Las muestras #5 y #6 (4,3%) estaban contaminadas con solo trigo (164 y 236 pg ADN_{Tr} / mg, respectivamente) y las 41 muestras de avena restantes (87,2%) estaban contaminadas con distintas proporciones de cebada (#7–#47). En 30 de estas 41 muestras (73,2%) el contenido de ADN de cebada superaba el 80% del total de ADN de trigo y cebada (**Tabla IV.11**). Los porcentajes de ADN de cebada (%) se calcularon dividiendo la cantidad de ADN de cebada (Q-PCR_{Cb}) entre la cantidad de ADN de trigo y cebada (Q-PCR_{Tr} + Q-PCR_{Cb}), y multiplicado este número por cien.

En la **Figura IV.31** se representa la distribución de los niveles de ADN de trigo y cebada (barras blancas y grises, respectivamente) de las muestras de avena de la **Tabla IV.11**. El 75% de las muestras estaban contaminadas con ADN de cebada en una concentración superior a 1 ng/mg. Sin embargo, sólo el 25% de las muestras tenían niveles de ADN de trigo por encima de esta concentración (y siempre por debajo de 10 ng/mg).

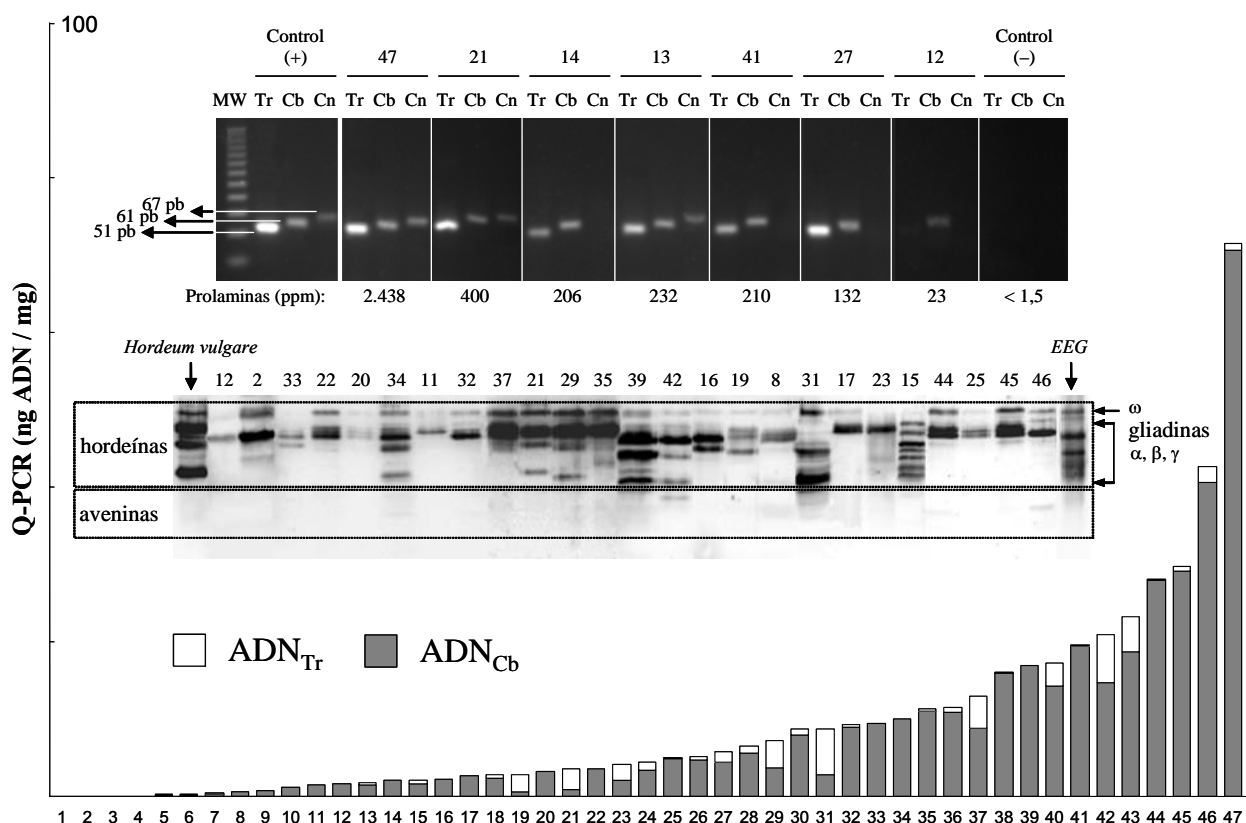


Figura IV.31 Análisis de 47 alimentos de avena mediante los sistemas individuales de Q-PCR de trigo y cebada, gel de agarosa y *Western Blot*. Las barras blancas representan los niveles de ADN de trigo y las barras grises los niveles de ADN de cebada (ng ADN / mg). (Arriba) Electroforesis en gel de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR® Green I 1x de los productos de amplificación de los sistemas individuales de Q-PCR de trigo (Tr), cebada (Cb) y centeno (Cn) obtenidos al analizar 7 alimentos de avena. Mediante flechas se señalan las posiciones relativas de los productos específicos de amplificación del sistema de trigo (51 pb), cebada (61 pb) y centeno (67 pb). Controles positivos: 50 pg de los correspondientes estándares de ADN. Control negativo: harina de maíz negativa por ELISA-R5 y Q-PCR. (Abajo) *Western Blot* basado en el AcM R5 del Estándar Europeo de Gliadinas (EEG) y de los extractos etanólicos de una harina de cebada (*Hordeum vulgare*, variedad Icare) y 25 alimentos de avena. En la imagen se señalan las posiciones relativas de las gliadinas (α, β, γ y ω), hordeínas y aveninas.

Entre los datos de prolaminas y los de ADN de trigo y cebada se observa una ligera correlación positiva: a medida que aumenta el contenido de ADN también aumenta el nivel de prolaminas (**Tabla IV.11**). Hasta que no se pudo cuantificar el ADN total de trigo, cebada y centeno (tanto con los sistemas individuales como con el sistema simultáneo de Q-PCR) no se pudo determinar si existía una correlación lineal entre los datos de prolaminas (método inmunológico) y los de ADN (método no inmunológico) (**apartado IV.6.4.6**). De las 47 muestras de avena, solamente 7 se analizaron con los tres sistemas individuales de Q-PCR (**Tabla IV.12**). En la **Figura IV.31** (arriba) aparece la electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de estas 7 muestras de avena. Como se puede observar, se obtuvo una separación lo suficientemente resuelta como para poder llegar a diferenciar los 3 productos de amplificación.

Tabla IV.12 Análisis mediante ELISA-R5 Sándwich y los tres sistemas individuales de Q-PCR (trigo, cebada y centeno) de 7 alimentos de avena de la [Tabla IV.11](#).

N	ELISA-R5	Q-PCR		
	Prolaminas (ppm)	Trigo (pg/mg)	Cebada (pg/mg)	Centeno (pg/mg)
12	23	<20	1.593	<500
13	232	241	1.803	1.221
14	206	96	1.999	<500
21	400	2.529	949	1.088
27	132	1.443	4.354	<500
41	210	175	19.358	<500
47	2.438	795	70.618	5.770

En el *Western Blot* de los extractos etanólicos de varias de estas muestras de avena contaminadas con distintos niveles de prolaminas ([Figura IV.31](#), abajo) sólo se detectaron bandas inmunorreactivas entre los 30 y los 50 kDa, que se corresponden con el rango de pesos moleculares de las gliadinas, hordeínas y secalinas. Por otro lado, no se detectaron bandas en la región de las aveninas (entre 20 y 30 kDa). Mediante esta técnica no se pudo distinguir el origen de la contaminación (si era de trigo, cebada y/o centeno) puesto que las gliadinas, hordeínas y secalinas migran en el mismo rango de pesos moleculares (entre 30 y 50 kDa) y simplemente por el número de bandas y/o su posición en el gel es muy difícil discriminarlas entre sí.

La presencia de bandas exclusivamente en la región de las gliadinas, hordeínas y secalinas demuestra que la mayoría de las muestras de avenas analizadas están contaminadas con trigo, cebada y/o centeno, y descarta una posible reactividad cruzada del AcM R5 con las aveninas. Además, los sistemas individuales de Q-PCR de trigo y cebada, así como las electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación, confirman la presencia de contaminaciones de ADN de trigo y cebada en estas muestras, siendo la cebada el cereal contaminante mayoritario.

Aunque se sabe que cereales como el maíz, el arroz o la soja son totalmente inofensivos para los enfermos celíacos, actualmente sigue en debate la toxicidad de la avena. La mayoría de la comunidad científica parece apoyar la idea de que la avena no es tóxica para el colectivo celíaco ([Janatuinen et al., 1995](#); [Srinivasan et al., 1996](#); [Hardman et al., 1997](#); [Holm et al., 1998](#); [Reunala et al., 1998](#); [Urbonas, 1999](#); [Hoffenberg et al., 2000](#); [Janatuinen et al., 2000](#); [Janatuinen](#)

et al., 2002; Storsrud *et al.*, 2003; Hogberg *et al.*, 2004; Holm *et al.*, 2006). Sin embargo, recientes publicaciones indican ciertas excepciones (Lundin *et al.*, 2003; Arentz-Hansen *et al.*, 2004; Peraaho *et al.*, 2004). De momento, y hasta que se clarifique su toxicidad, el *Codex Alimentarius* considera a la avena como uno de los cuatro cereales tóxicos para los enfermos celíacos⁴.

Sin embargo, algunos países europeos (como Noruega, Suecia o Finlandia) han dado luz verde al consumo de avena por parte del colectivo celíaco. Esto supone un riesgo para su salud, puesto que como se ha demostrado en esta Tesis Doctoral y en otras publicaciones científicas recientes (Janssen *et al.*, 1998; Thompson, 2004), las muestras de avena analizadas están masivamente contaminadas con altos niveles de prolaminas (por encima de las 100 ppm), muy superiores a los observados en alimentos “sin-gluten” convencionales, o alimentos elaborados a partir de arroz o maíz (Valdes *et al.*, 2003). Además, la mayoría de estas contaminaciones son de cebada y, por lo tanto, indetectables con el ELISA basado en el anticuerpo contra las ω -gliadinas (considerado todavía como método oficial de cuantificación de gluten en varios de estos países europeos).

IV.7.5. Alimentos en los que el gluten se encuentra parcial o totalmente hidrolizado

El ADN es una molécula considerablemente estable y persistente (Paabo, 1989; Paabo *et al.*, 1989), no obstante algunos métodos de producción, procesado y almacenamiento de alimentos y productos alimenticios pueden degradar el ADN originando una reducción en la longitud de las moléculas, sin que generalmente se produzcan cambios en la secuencia. La degradación de los ácidos nucleicos en alimentos puede deberse a agentes físicos, tales como tratamientos térmicos (Meyer *et al.*, 1994; Straub *et al.*, 1999a; Straub *et al.*, 1999b), tratamientos mecánicos agresivos, frecuentes en operaciones básicas de la industria alimentaria (Pauli *et al.*, 1998), agentes químicos (Gawienowski *et al.*, 1999), acidez (Hupfer *et al.*, 1998; Hupfer *et al.*, 1999) o enzimas nucleolíticas (Ausubel *et al.*, 2002).

⁴ Comisión del *Codex Alimentarius*, 1981. Programa conjunto FAO/WHO sobre Estandarización Alimentaria: Estandarización de los “Alimentos Sin-Gluten”, Codex Stan 118-1981 (enmendado en 1983).

IV.7.5.1. Cervezas, siropes y extractos de malta

Otro de nuestros objetivos fue verificar si con los sistemas desarrollados de Q-PCR se podía detectar ADN en aquellos alimentos donde el gluten se encuentra muy hidrolizado, como es el caso de las *cervezas*, los *siropes* y los *extractos de malta*. El análisis de algunas de estas muestras con el *ELISA-R5 Competitivo* dieron contaminaciones de prolaminas entre 7 y 4.755 ppm (**Tabla IV.13**). Sin embargo, en ninguna de ellas se detectó ADN, ni con el sistema individual de trigo (Q-PCR_{Tr}), ni con el sistema simultáneo (Q-PCR_{TCC}). El análisis por geles de agarosa de algunas muestras hidrolizadas (como los siropes y las cervezas) también confirmó la ausencia de producto de amplificación (**Figura IV.32**).

La falta de detección de los sistemas de Q-PCR en alimentos hidrolizados es probablemente debida a que el ADN de estas muestras se encuentra degradado y/o fragmentado en trozos tan pequeños que no pueden ser amplificados con los *primers* de los sistemas de Q-PCR. A pesar de que las prolaminas también se encuentran hidrolizadas, si tienen algún epítipo QQPFP, aún pueden ser detectadas con el *ELISA-R5 Competitivo* (**apartado I.2.2.1.3**).

Tabla IV.13 Incompatibilidad de los sistemas de Q-PCR de trigo (Tr) y trigo/cebada/centeno (TCC) en el análisis de alimentos contaminados con gluten en los que el ADN se encuentra hidrolizado.

Muestra	ELISA-R5 Competitivo (ppm prolaminas)	Q-PCR _{TCC} (pg ADN _{TCC} / mg)	Q-PCR _{Tr} (pg ADN _{Tr} / mg)
Cerveza de cebada 1	51	< 500	-
Cerveza de cebada 2	48	< 500	-
Cerveza de cebada 3	32	< 500	-
Cerveza de cebada 4	806	-	< 20
Cerveza de cebada 5	2.360	-	< 20
Cerveza de trigo 1	21	-	< 20
Cerveza de trigo 2	369	-	< 20
Sirope 1	105	< 500	-
Sirope 2	102	< 500	< 20
Sirope 3	57	< 500	-
Sirope de trigo 1	7	-	< 20
Sirope de trigo 2	44	-	< 20
Sirope de trigo 3	105	-	< 20
Extracto de malta 1	4.755	< 500	-
Extracto de malta 2	697	< 500	< 20
Extracto de malta 3	600	< 500	-
Extracto de malta 4	487	< 500	-

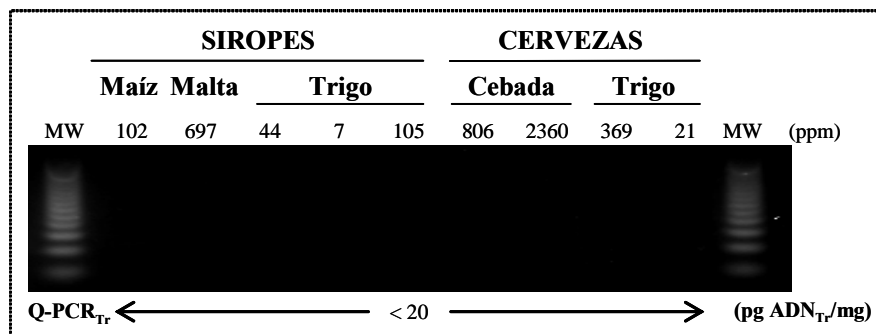


Figura IV.32 Electroforesis en gels de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR® Green I 1x de los productos de amplificación del sistema de Q-PCR de trigo (Q-PCR_{Tr}) obtenidos al analizar cinco siropes y cuatro cervezas. El contenido de prolaminas de las muestras (ppm) se cuantificó con el ELISA-R5 Competitivo y los niveles de ADN (pg ADN_{Tr} / mg) se determinaron con el sistema optimizado de Q-PCR_{Tr}.

IV.7.5.2. Cereales para el desayuno

El *extracto de malta* es uno de los principales ingredientes de los cereales para el desayuno. Este jarabe o sirope se obtiene a partir de la hidrólisis de la malta de cebada y se utiliza para endulzar los cereales para el desayuno. Como ya se ha descrito en el [apartado IV.7.5.1](#), el ADN de los extractos de malta se encuentra muy hidrolizado.

En este estudio se utilizaron seis cereales para el desayuno tipo “*Corn Flakes*” ([Tabla IV.14](#)) enviados por el *Departamento de Investigación y Desarrollo del Ministerio de Alimentación Nacional de Suecia*. Estas muestras, consumidas habitualmente por la población celiaca de los países nórdicos, fueron analizadas en dicho laboratorio estatal mediante el **ELISA- ω Sándwich** (Skerritt & Hill, 1991), insensible a las prolaminas de cebada (*hordeínas*). Como se puede observar en la [Tabla IV.14](#), los niveles de prolaminas calculados con el ELISA- ω estuvieron alrededor del nivel de sensibilidad del método (≤ 5 ppm).

Por el contrario, las muestras que llevaban en su composición “extracto de malta de cebada”, dieron unos niveles de prolaminas muy altos con el ELISA-R5 “Sándwich” y “Competitivo” ([Tabla IV.14](#)). El hecho de que los niveles de prolaminas calculados con el ELISA-R5 Competitivo sean superiores a los del ELISA-R5 Sándwich (entre 1,5 y 1,8 veces) indica que estas muestras estaban parcialmente hidrolizadas. Los análisis por *Western Blot* R5 confirman estos resultados ([Figura IV.33](#)): aunque la mayoría de las bandas inmunorreactivas se encontraban entre los 30 y los 50 kDa (que se corresponden con el rango de pesos moleculares de las prolaminas nativas), también se detectaron algunas bandas por debajo de los 30 kDa, que se corresponden con prolaminas ligeramente hidrolizadas ([Figura IV.33](#)).

El hecho de que las muestras de “*Corn Flakes*” dieran negativo con los sistemas de Q-PCR de cebada y trigo/cebada/centeno (**Tabla IV.14**) indica que el ADN se encontraba degradado y/o fragmentado (como en el caso de las *cervezas*, los *siropes* y los *extractos de malta*).

Tabla IV.14 Análisis de seis cereales para el desayuno tipo “*Corn Flakes*” mediante ELISA- ω Sándwich, ELISA-R5 (Sándwich y Competitivo) y Q-PCR [de cebada (Cb) y trigo/cebada/centeno (TCC)].

N	Ingredientes	ELISA- ω Sándwich (ppm de prolaminas)	ELISA-R5 (ppm de prolaminas)		Q-PCR (pg ADN / mg)	
			Sándwich	Competitivo	Cb	TCC
A	Extracto de malta (cebada)	5	168	248	< 100	< 500
B	Extracto de malta (cebada)	5	176	269	< 100	< 500
C	Malta (cebada)	ND	< 1,5	< 3	< 100	< 500
D	Malta (maíz)	ND	< 1,5	< 3	< 100	< 500
E	Extracto de malta (cebada)	< 5	201	372	< 100	< 500
F	Extracto de malta (cebada)	< 5	245	393	< 100	< 500

ND: No Determinado

Como consecuencia de los niveles de gluten tan elevados (superiores a las 200 ppm) de algunos de estos “*Corn Flakes*”, que se consumían desde hace años por el colectivo celiaco de los países nórdicos, las administraciones públicas de estos países decidieron en 2006 eliminar los “*Corn Flakes*” del listado de alimentos aptos para el consumo por parte de este colectivo. Estos resultados demuestran la importancia de disponer métodos como el ELISA-R5, capaces de detectar cebada (insensible con el ELISA- ω Sándwich), con el correspondiente beneficio para la salud de los celíacos.

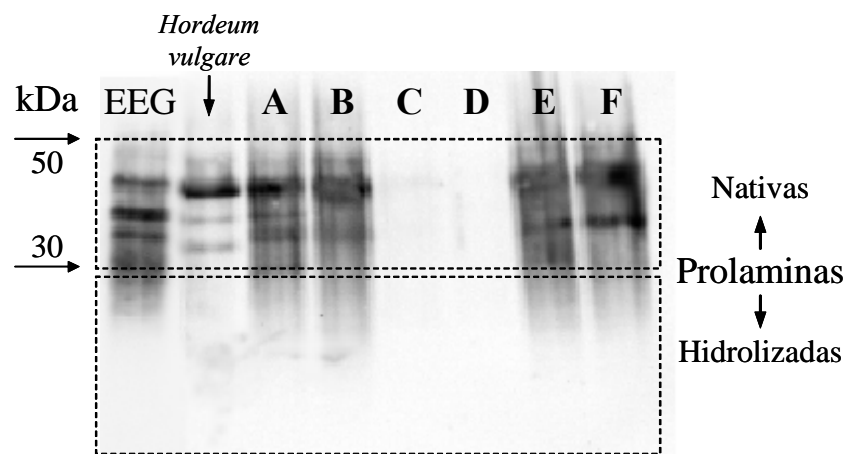


Figura IV.33 Western Blot basado en el AcM R5 del Estándar Europeo de Gliadinas (EEG) y de los extractos etanólicos de una harina de cebada (*Hordeum vulgare*, variedad Volga) y de seis cereales para el desayuno tipo “Corn Flakes” (Tabla IV.14). En la imagen se señalan las posiciones relativas de las prolaminas (entre 30 y 50 kDa), así como de las prolaminas nativas e hidrolizadas.

IV.7.5.3. Papillas infantiles

A diferencia de las *cervezas*, los *siropes*, los *extractos de malta*, los *cereales para el desayuno...* (donde el ADN se encuentra muy hidrolizado), las *papillas infantiles* son sometidas a “ligeros” tratamientos hidrolíticos (Hernando *et al.*, 2004) que fragmentan al ADN en trozos lo suficiente grandes como para poder ser amplificados con los *primers* del sistema individual de Q-PCR de trigo (Q-PCR_{Tr}). En la **Figura IV.30.B** se muestran los niveles de ADN de trigo, así como la identificación de los productos de amplificación, de un grupo de papillas infantiles analizadas con el sistema de Q-PCR_{Tr}. Por lo tanto, este sistema es válido para analizar papillas infantiles.

IV.7.6. Alimentos “sin-gluten” basados en el teff

El **teff** es un cereal de origen etíope, filogenéticamente distanciado del trigo, la cebada y el centeno (Tatham *et al.*, 1996; Retama, 1997). Un estudio reciente de toxicidad “*in vitro*” sugiere que el teff no es tóxico para los enfermos celíacos (Spaenij-Dekking *et al.*, 2005a).

En 2005 se introdujo el teff en Holanda como un nuevo cereal para la elaboración de alimentos “sin-gluten”. Desde entonces, un número importante de celíacos holandeses han experimentado diversos síntomas al consumir estos productos. En 2006, la *Asociación de Celíacos de Holanda* (NCV) envió a la Unidad de Gluten algunas de estas muestras (Tabla IV.15), con el objeto de confirmar si los síntomas observados estaban causados por contaminaciones de gluten.

Se analizaron un total de nueve muestras de teff mediante ELISA-R5 Sándwich, así como por el sistema simultáneo de Q-PCR ($Q\text{-PCR}_{TCC}$) y por *Western Blot* (WB). Las tres mezclas integrales para hornear tenían unos niveles de prolaminas de 45, 50 y 83 ppm, y unos niveles de ADN de 621, 1.155 y 1.945 pg ADN_{TCC}/mg, respectivamente (**Tabla IV.15**). Estas contaminaciones se confirmaron mediante *Western Blot* y electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación (**Figura IV.34**).

Tabla IV.15 Análisis de nueve alimentos de teff mediante ELISA-R5 Sándwich y el sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno ($Q\text{-PCR}_{TCC}$) y síntomas derivados de su consumo.

N	Muestra	ELISA-R5 (ppm prolaminas)	Q-PCR _{TCC} (pg ADN _{TCC} / mg)	Síntomas derivados de su consumo
1	Mezcla para hornear	<1,5	<500	Ardor de estómago, elevado número de deposiciones, cansancio. Síntomas parecidos a los provocados por la ingesta de gluten.
2	Harina integral (teff puro)	3	<500	Dolor de cabeza, retorcijones. Los síntomas desaparecieron cuando el paciente dejó de consumir teff.
3	Mezcla integral para hornear	45	621	Eczemas (similares a los provocados por la ingesta de gluten). Los síntomas desaparecieron cuando el paciente dejó de consumir teff.
4	Mezcla integral para hornear	50	1.155	Ardor de estómago, cara cansada e hinchada, mal humor. Los síntomas desaparecieron cuando el paciente dejó de consumir teff. Más miembros de la familia con EC sufrieron síntomas parecidos.
5	Mezcla integral para hornear	83	1.945	Estómago dilatado, náuseas. Síntomas parecidos a los provocados por la ingesta de gluten. Los síntomas desaparecieron cuando el paciente dejó de consumir teff y reaparecieron cuando se reintrodujo el teff en la dieta.
6	Harina blanca (teff puro)	2	<500	
7	Mezcla para hornear	3	<500	
8	Harina integral (teff puro)	<1,5	<500	Úlceras de boca (dentro de ambas mejillas). Los síntomas desaparecieron cuando el paciente dejó de consumir teff.
9	Harina integral (teff puro)	<1,5	<500	Problemas intestinales: diarrea y náuseas.

A pesar de que el resto de muestras estaban muy poco contaminadas (<4 ppm prolaminas y <500 pg ADN_{TCC}/mg), algunas de ellas generaron diversas molestias intestinales (**Tabla IV.15**). Aunque el estudio “*in vitro*” de Spaenij-Dekking y colaboradores apoya su inocuidad (Spaenij-Dekking *et al.*, 2005a), todavía no se puede descartar la toxicidad del teff en los enfermos celíacos. Como consecuencia de estos resultados, y como medida preventiva, Holanda ha decidido eliminar los alimentos a base de teff del listado de alimentos aptos para el consumo por parte del colectivo celíaco.

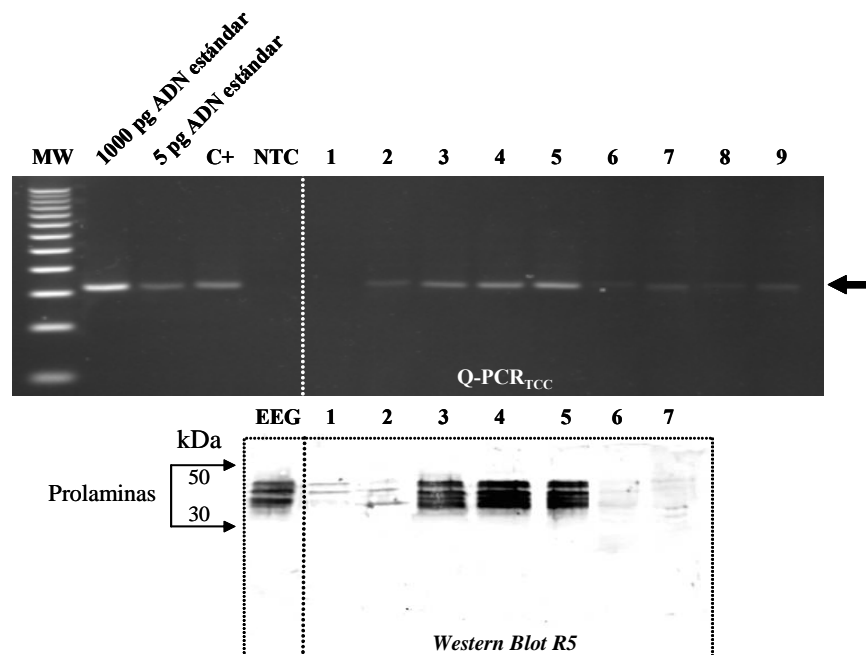


Figura IV.34 (Arriba) Electroforesis en gel de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR® Green I 1x de los productos de amplificación del sistema simultáneo de Q-PCR (Q-PCR_{TCC}) obtenidos al analizar las nueve muestras de teff de la [Tabla IV.15](#). Con una flecha se señala los productos específicos de amplificación (entre 78 y 81 pb). Control positivo: harina de avena positiva por ELISA-R5 y por los tres sistemas individuales de Q-PCR. (Abajo) *Western Blot* basado en el AcM R5 del Estándar Europeo de Gliadinas (EEG) y de los extractos etanólicos de siete muestras de teff. En la imagen se señalan las posiciones relativas de las prolaminas (entre 30 y 50 kDa).

IV.7.7. Confirmación de los niveles de prolaminas mediante técnicas alternativas (Q-PCR, *Western Blot* y EM MALDI-TOF)

Para este estudio se seleccionaron siete alimentos positivos por ELISA-R5 Sándwich, con unos niveles de prolaminas entre 56 y 6.125 ppm ([Figura IV.35](#), muestras A-G). Todos estos alimentos también dieron positivo con el sistema individual de Q-PCR de trigo. Cuando se analizaron los extractos etanólicos mediante EM MALDI-TOF, se obtuvieron unos espectros de masas con el típico perfil de las *gliadinas*, con unas masas moleculares comprendidas entre los 30 y los 60 kDa ([Figura IV.35](#)). A pesar de la gran heterogeneidad y la alta variabilidad genética de las gliadinas, el perfil de masas está muy conservado entre las distintas variedades de trigo (Camafeita *et al.*, 1997a). En la [Figura IV.35](#) se pueden observar tanto las fracciones α y β/γ de las gliadinas (entre 30 y 40 kDa), así como la fracción ω (entre 40 y 60 kDa). Rutinariamente, para identificar las gliadinas en alimentos contaminados con trigo se suele utilizar el rango de masas moleculares comprendido entre los 30 y los 40 kDa (Camafeita *et al.*, 1997b; Camafeita & Mendez, 1998; Camafeita *et al.*, 1998; Mendez *et al.*, 2000; Hernando *et al.*, 2003).

Tanto la EM MALDI-TOF ([apartado I.2.3.1](#)) como el *Western Blot R5* ([apartado I.2.2.2](#)) son capaces de determinar si un alimento ha sido o no tratado con calor. Las fracciones α y β/γ de las prolaminas se desnaturalizan con el calor y forman agregados insolubles que no pueden ser extraídos en su totalidad con el método convencional de etanol 60%, mientras que la fracción ω es termoestable y se extrae cuantitativamente con etanol 60% (Wieser, 1998). En la [Figura IV.35](#) aparecen varios alimentos tratados con calor (muestras C, E y F), donde aparece muy aumentada la señal de las ω -gliadinas respecto de las α - y β/γ -gliadinas, llegando incluso a desaparecer en aquellos alimentos sometidos a un elevado tratamiento térmico ([Figura IV.35](#), muestra C).

Por lo tanto, se puede concluir que el ELISA-R5 y el *Western Blot R5*, en conjunción con otras técnicas no inmunológicas alternativas y complementarias (como la EM MALDI-TOF y la Q-PCR), permiten la confirmación inequívoca de contaminaciones de trigo, cebada y/o centeno en alimentos, garantizando la dieta “sin-gluten” del colectivo celiaco.

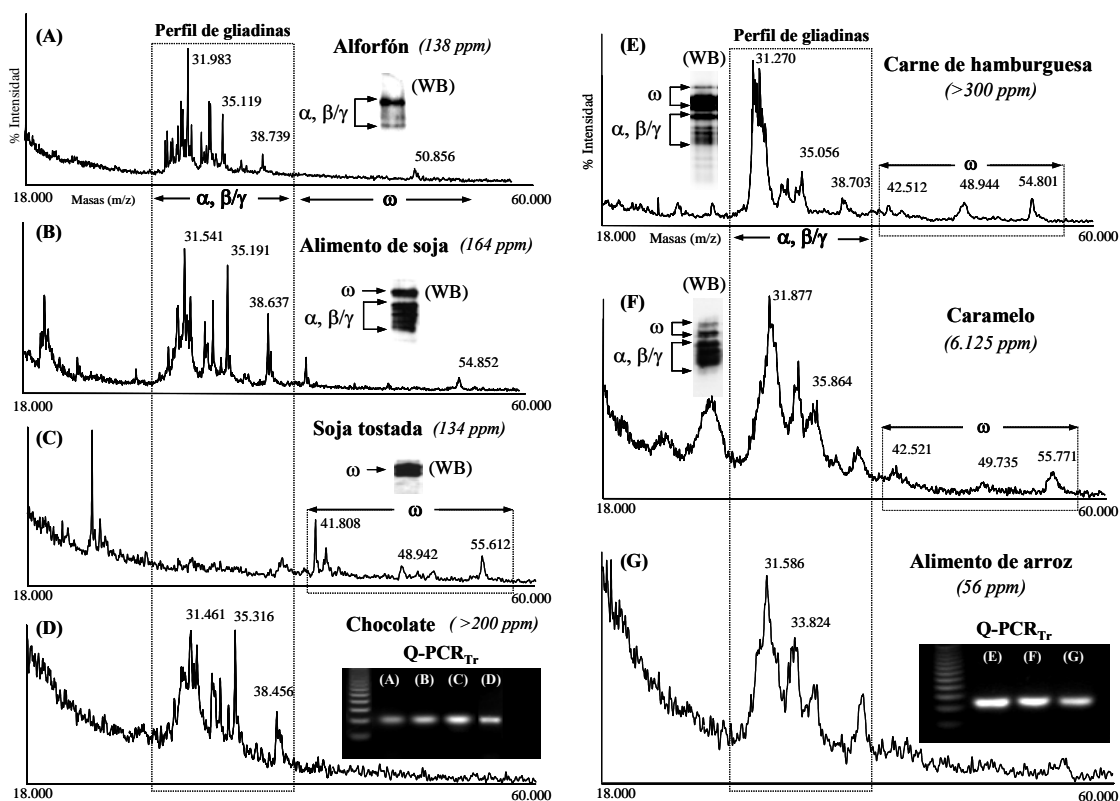


Figura IV.35 Confirmación de la presencia de prolaminas en alimentos mediante técnicas alternativas: ELISA-R5 Sándwich (ppm de gliadinas), Espectrometría de Masas MALDI-TOF, *Western Blot R5* de los extractos etanólicos (WB) y electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación del sistema individual de Q-PCR de trigo (Q-PCR_{Tr}).

IV.8. ESTUDIO DEL EFECTO DEL CALOR SOBRE EL CONTENIDO DE PROLAMINAS Y ADN EN LOS ALIMENTOS “SIN-GLUTEN”

Para llevar a cabo este estudio, se utilizó una harina de maíz negativa tanto por ELISA-R5 Sándwich (< 1,5 ppm de prolaminas) como por los cuatro sistemas de Q-PCR desarrollados en esta Tesis Doctoral (< 0,5 ng ADN / mg muestra). Esta harina de maíz se contaminó al 1% (w/w) con harina de trigo (*Triticum durum*, variedad Araldun) y se calentaron cantidades de 1.200 mg de esta harina contaminada artificialmente en un horno *Heraeus* (C.R. Marés S.A., Barcelona, España) durante 1 hora a 60, 115, 150 y 180°C.

Las prolaminas se extrajeron con el “*Cocktail Solution*” ([apartado III.7.2.2](#)) y se cuantificaron con el método de ELISA-R5 Sándwich ([apartado III.7.4](#)). El ADN se extrajo con el método desarrollado y optimizado en esta Tesis Doctoral ([apartado III.2.2.4](#)) y se cuantificó con el sistema individual de Q-PCR de trigo y el sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 3% teñidos con *SYBR[®] Green I 1x*.

Se hicieron dos extracciones de cada muestra –sin calentar (control) y calentadas a las temperaturas arriba indicadas– y cada extracto se analizó por duplicado. La muestra calentada a 60°C dio unos niveles de prolaminas y ADN superiores a los determinados en la muestra sin calentar o muestra control ([Figura IV.36](#)). Probablemente, al calentar 1 hora a 60°C lo que se hizo fue eliminar el agua de la muestra y, por lo tanto, concentrar el contenido de prolaminas y ADN por unidad de masa.

De 60 a 150°C la cantidad de ADN fue disminuyendo progresivamente, dando lugar a una infraestimación de hasta el 66% en la cuantificación del ADN_{Tr} y del 35% en la cuantificación del ADN_{TCC} ([Figura IV.36](#)). Parece ser que el menor tamaño del producto de amplificación del sistema de Q-PCR_{Tr} respecto del sistema de Q-PCR_{TCC} (51 frente a 78-81 pb) ha permitido detectar y cuantificar más ADN_{Tr} que ADN_{TCC} en la muestra calentada 1 hora a 150°C ([Figura IV.36](#)). Por otro lado, los niveles de prolaminas de estas harinas se mantuvieron constantes. Aunque las proteínas se encuentran desnaturalizadas por el calor, el “*Cocktail de Extracción*” es capaz de solubilizar los agregados insolubles, abrir la conformación de las prolaminas y favorecer su solubilidad en etanol 60%, permitiendo así su correcta cuantificación con el método de ELISA-R5 Sándwich ([apartado I.2.1](#)).

A pesar del pequeño tamaño de los productos de amplificación, a 180°C el ADN se ha degradado y/o fragmentado en trozos tan pequeños que no pueden ser amplificados por los *primers* de los sistemas de Q-PCR (**Figura IV.36**). Sin embargo, con el ELISA-R5 Sandwich aún se puede detectar algo de prolaminas (**Figura IV.36**).

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que tanto el método de cuantificación de prolaminas (ELISA-R5 Sándwich) como los sistemas de cuantificación de ADN (Q-PCR) son válidos para el análisis de muestras con cierto grado de procesamiento térmico (hasta 1 hora a 115°C). Sin embargo, cuando el tratamiento térmico es mayor (calentamientos de hasta 1 hora a 150°C) la combinación del “*Cocktail de Extracción*” junto con el ELISA-R5 Sandwich proporciona unos valores más acordes con la realidad que los sistemas de Q-PCR desarrollados.

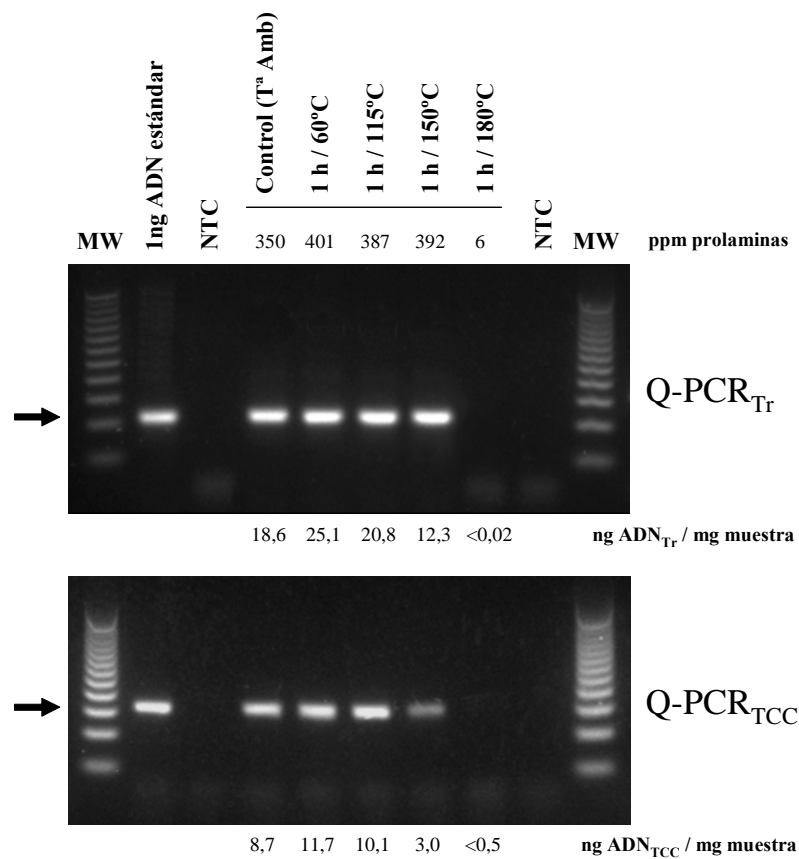


Figura IV.36 Electroforesis en geles de agarosa al 3% (w/v) conteniendo SYBR® Green I 1x de los productos de amplificación del sistema individual de Q-PCR de trigo (Q-PCR_{Tr}, arriba) y el sistema simultáneo de Q-PCR de trigo/cebada/centeno (Q-PCR_{TCC}, abajo) de una harina de maíz contaminada al 1% (w/w) con trigo (*Triticum durum*, variedad Araldun), sin calentar (control) y calentada durante 1 hora a 60, 115, 150 y 180°C. Con una flecha se señala el producto específico de amplificación (51 pb para el sistema de Q-PCR_{Tr} y 78-81 pb para el sistema de Q-PCR_{TCC}).

IV.9. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE Q-PCR DE TRIGO BASADO EN SONDAS TAQMAN[®]

IV.9.1. Diseño y optimización de los *primers* y la sonda TaqMan[®]

Para el diseño de los *primers* y la sonda del sistema TaqMan[®] de trigo se seleccionó la misma secuencia de ADN empleada para el sistema de SYBR[®] Green I ([apartado IV.2.1.1](#)). No se pudieron utilizar los mismos *primers* (**W.F1** y **W.R1**) puesto que no había suficiente espacio entre ellos como para poder insertar una sonda TaqMan[®] ([apartado III.4](#)). Fijando el *primer* directo **W.F1**, y con la ayuda del software *Primer Express*[™] v2.0, se diseñaron el *primer* reverso **W.F3** y la sonda TaqMan[®] **TM.1** ([Figura IV.37](#)). El sistema hibrida (con una homología del 100%) con siete de las doce repeticiones y amplifica un fragmento de 65 pares de bases (pb).

(pb)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Consenso	CGTCGTGGACGGAAAGTTG <u>ACGCGCGCCATGGAAA</u> ACTGGGCAAACC ACGTACGTGGCACACGCC CGCGTACACGGACCCTTACACGGAcCnGTGAACGGGCTGTACGTGGACACGGGAAAAAGTGCCCGAnCGGC												
01C.....G.....G.....C.G.....-												
02G.....C.G.A.A.....												
03	...C.....G.....A.....C.....-.....A.....-												
04C.....-												
05	...A.....-												
06G.....-												
07C.....-												
08C.....G.....-												
09G.....-												
10	...GC.....C.....-												
11G.....-												
12A.....T.....G.....-												

Figura IV.37 Alineamiento de las 12 repeticiones de la *familia A* de la región intergénica limitada por los genes que codifican para los ARN ribosomales 25S y 18S de *Triticum aestivum* (GenBank / X07841). Las secuencias de los *primers* del sistema TaqMan® de Q-PCR de trigo (**W.F1 / W.R3**) aparecen en negra y la sonda (**TM.1**) subrayada.

Como la afinidad de los *primers* por el ADN molde no siempre es la misma, hubo que averiguar qué concentración de cada uno de ellos era la adecuada para obtener por Q-PCR una mayor y mejor respuesta. Para ello se diseñó una *matriz de primers*, combinando distintas concentraciones del *primer* directo (300 nM, 600 nM, 900 nM) con el *primer* reverso (300 nM, 600 nM, 900 nM). Para este ensayo se utilizó una concentración de sonda invariable y en exceso (250 nM).

Con cada combinación de *primers*, se amplificó (por duplicado) 1 ng del estándar de ADN de trigo, la dilución 1/5 de los extractos de ADN de distintos controles negativos y el NTC (sólo mezcla de reacción, sin ADN molde). Se escogió la combinación **300 nM x 300 nM**, que proporcionaba:

- (a) En el caso del estándar de ADN, los valores de C_T más bajos con las mayores fluorescencias.
- (b) En el caso de los controles negativos y el NTC, los valores de C_T más altos con las menores fluorescencias.

A continuación se optimizó la concentración de sonda (250, 200, 150 y 100 nM), manteniendo constante las concentraciones óptimas de los *primers* (300 nM x 300 nM). Se escogió la concentración de sonda más baja que proporcionaba la menor pérdida de sensibilidad (150 nM).

IV.9.2. Especificidad del sistema

Para determinar la especificidad del sistema TaqMan® de Q-PCR trigo, se amplificaron 1 ng de ADN purificado a partir de cereales relacionados filogenéticamente, como el centeno (*Secale cereale*), la cebada (*Hordeum vulgare*), la avena (*Avena sativa*), el maíz (*Zea mays*) o el arroz (*Oryza sativa*), y de otras especies vegetales distanciadas filogenéticamente, pero que son la base de muchos alimentos “sin-gluten”, como la soja (*Glycine max*) o el alforfón (*Fagopyrum esculentum*). Se utilizaron los mismos métodos de extracción, purificación y cuantificación de ADN que los empleados con las variedades de los estándares de ADN ([apartado III.3](#)). Sólo el estándar de ADN de trigo dio positivo, mientras que el resto de muestras no dieron ninguna señal ([Figura IV.38](#)). El control negativo de la reacción de amplificación (NTC), donde el extracto de ADN se sustituye por agua milli-Q estéril, tampoco dio señal alguna.

IV.9.3. Elaboración de la curva estándar de ADN de trigo

Para cuantificar el ADN de trigo en muestras problema se emplearon curvas de calibrado elaboradas a partir de diluciones seriadas del estándar de ADN de trigo (apartado III.3.3). La Figura IV.38 muestra las curvas de amplificación de una típica curva de calibrado: 1.000, 100, 10, 1 y 0,1 pg por reacción (equivalentes a 57, 5,7, 0,57, 0,057 y 0,006 genomas haploides por reacción). Tras ajustar el umbral de detección o *threshold* a 0,2 unidades de fluorescencia (UF), se obtuvieron unos valores de C_T muy parecidos a los obtenidos con el SYBR[®] Green I.

Una vez terminada la reacción de amplificación, el programa *ABI PRISM[®] 7000 SDS v1.1* generó un gráfico de los logaritmos de las cantidades del estándar de ADN de trigo contra sus correspondientes valores de C_T . El resultado de la regresión lineal de estos puntos se muestra en el inserto de la Figura IV.38. El ajuste de los datos experimentales a la recta de regresión calculada fue muy bueno, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9987. La cuantificación de ADN de trigo en muestras problema se hizo interpolando en esta recta de regresión los valores de C_T obtenidos.

La pendiente de la recta de calibrado refleja la eficiencia del sistema. La pendiente de una recta de calibrado con una eficiencia del 100% tiene un valor (absoluto) de 3,322, que son los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. A medida que se pierde eficiencia, aumenta la pendiente y, por lo tanto, los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. Aplicando la fórmula $E (\%) = [10^{-(1/Pendiente)} - 1] \cdot 100$ (Watanabe *et al.*, 1991), se calculó una eficiencia media del sistema TaqMan[®] de Q-PCR de trigo del 94%.

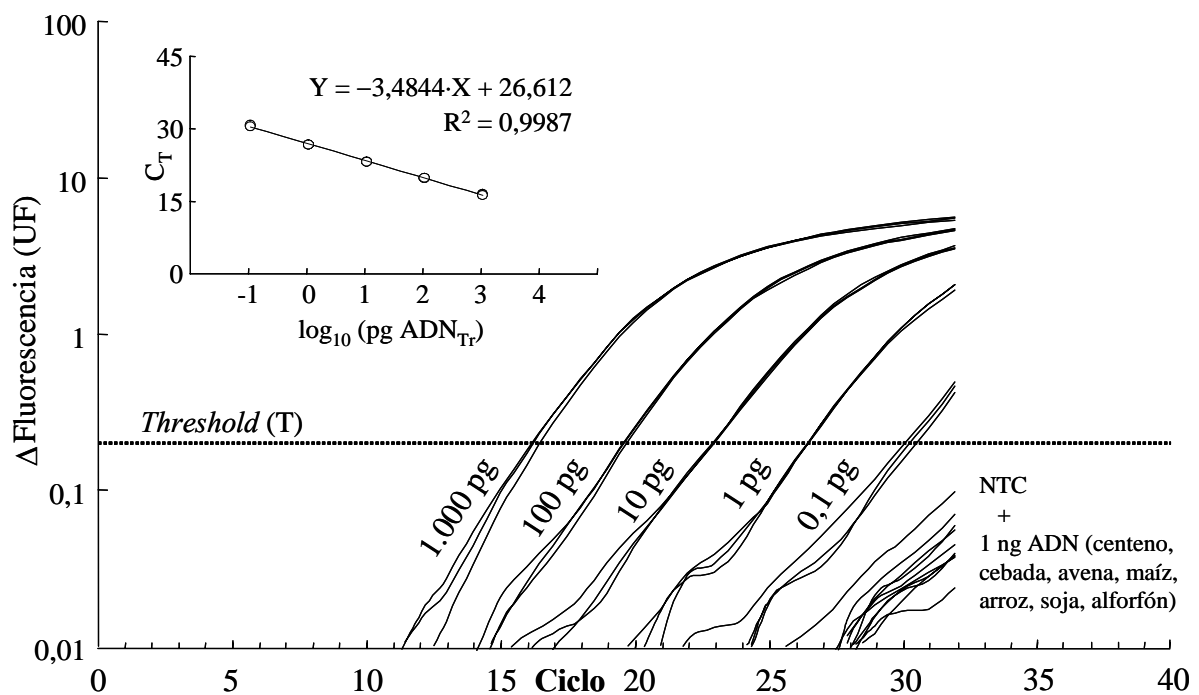


Figura IV.38 Curva estándar de ADN de trigo, desde 1.000 hasta 0,1 pg. El inserto muestra el ajuste lineal de la correspondiente recta de calibrado. La línea del umbral de detección o *threshold* (T) se fijó en 0,2 UF.

Se puede concluir que los niveles de sensibilidad y eficiencia del sistema TaqMan® de Q-PCR de trigo son muy similares a los obtenidos con el sistema de SYBR® Green I ([apartado IV.6.1.2](#)).

IV.9.4. Estudio del efecto inhibitorio de los extractos del método Wizard® sin fase de purificación sobre el sistema TaqMan® de Q-PCR de trigo

Para este estudio se contaminaron los extractos de ADN de tres harinas de maíz, arroz y avena (todas ellas negativas por ELISA-R5 y Q-PCR_{Tr}) con cantidades conocidas del estándar de ADN de trigo, hasta una concentración final de 250 pg ADN_{Tr} por μL . La extracción de los ácidos nucleicos se hizo con el método Wizard® sin fase de purificación y en las condiciones optimizadas (20 mg de muestra en 800 μL de reactivos de extracción, calentados durante 30 minutos a 100°C). Antes de ser cuantificados con los dos sistemas desarrollados de Q-PCR de trigo [SYBR® Green I ([apartado IV.6.1](#)) y TaqMan® ([apartado IV.9](#))], los extractos de ADN se diluyeron 1/5, 1/25 y 1/50 en agua milli-Q estéril.

En la **Figura IV.39** aparecen los resultados de este estudio (expresados en tanto por ciento de recuperación). No se observaron inhibiciones con el sistema de SYBR® Green I, llegándose a recuperar entre el 79 y el 103% del ADN_{Tr} (**Figura IV.39**). Sin embargo, alguno de los reactivos de extracción o de los ingredientes de los alimentos parecía inhibir el sistema de sondas TaqMan® (**Figura IV.39**), obteniéndose unos valores de concentración de ADN_{Tr} más bajos de lo esperado (< 250 pg ADN_{Tr} / µL). Al aumentar la dilución de los extractos de ADN (de 1/5 a 1/50), también se diluía la sustancia o sustancias que afectaban al sistema de sondas TaqMan®, aumentando el rendimiento de recuperación del ADN (**Figura IV.39**).

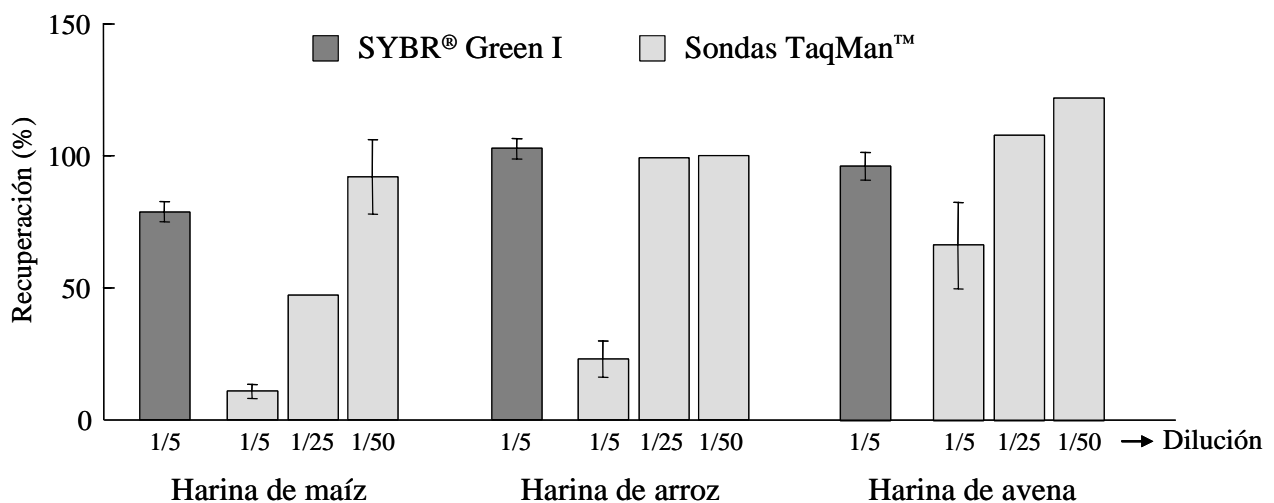


Figura IV.39 Estudio del efecto inhibitorio de los extractos del método Wizard® sin fase de purificación (diluidos 1/5, 1/25 y 1/50 en agua milli-Q estéril) sobre los sistemas de Q-PCR de trigo: SYBR® Green vs TaqMan®. Los extractos de ADN de tres harinas negativas por ELISA-R5 y Q-PCR_{Tr} fueron contaminados con cantidades conocidas del estándar de ADN de trigo y cuantificados con los dos sistemas desarrollados de Q-PCR de trigo. Las recuperaciones y sus correspondientes desviaciones estándar están expresadas en tanto por ciento (%).

Podemos concluir que la calidad de la dilución 1/5 del ADN extraído con el método *Wizard*® sin purificar es suficiente para el sistema de SYBR® Green I. Sin embargo, si se quieren cuantificar los extractos con el sistema de sondas TaqMan®, es necesario aumentar la dilución de los extractos por encima de 1/50.

IV.9.5. Comparación de los sistemas de SYBR® Green I y sondas TaqMan®

En este estudio se cuantificaron los niveles de ADN de trigo de seis alimentos “sin-gluten” mediante los sistemas de SYBR® Green I (dilución 1/5) y sondas TaqMan® (diluciones 1/5, 1/25, 1/50 y 1/100). De los seis alimentos analizados, cinco estaban contaminados con niveles de prolaminas entre 20 y 76 ppm (#2-6) y solamente uno dio negativo por ELISA-R5 Sándwich (#1).

Como se puede observar en la [Tabla IV.16](#), a medida que se diluyeron los extractos, los niveles de ADN de trigo cuantificados con el sistema TaqMan® se aproximaron a los obtenidos con la dilución 1/5 del sistema de SYBR® Green I. Las diluciones que se necesitaron fueron tan altas (1/50 para las muestras #1, #2, #3 y 1/100 para las muestras #4, #5, #6) que se disminuyó la sensibilidad del sistema. En este sentido, la dilución 1/100 de las dos muestras menos contaminadas (#1 y #2) se salieron del rango de cuantificación (> 30 ciclos), haciendo imposible su determinación.

Tabla IV.16 Niveles de ADN de trigo de seis alimentos “sin-gluten” determinados con los sistemas de SYBR® Green I y sondas TaqMan®.

	Prolaminas (ppm)	ADN de trigo (pg ADN / mg)					
		ELISA-R5 Sandwich	SYBR Green I (1/5)	(1/5)	(1/25)	(1/50)	(1/100)
(1) Harina de avena	< 1,5		261	99	135	270	-
(2) Harina de maíz	20		49	4	23	59	-
(3) Harina de arroz	76		1.810	203	443	2.140	1.974
(4) Potito de arroz	29		96	ND	ND	90	103
(5) Copos de avena	50		505	ND	ND	232	418
(6) Alimento de soja	70		447	ND	ND	297	452

ND: No Determinado

Para confirmar que la inhibición procedía de alguno de los reactivos empleados en el protocolo de extracción y/o alguno de los componente de la matriz de los alimentos, se purificaron los extractos de ADN de las muestras #3, #4 y #6 con columnas *CONCERT™ Rapid Plasmid Miniprep* ([apartado III.3.2.2](#)) y se volvieron a cuantificar por ambos sistemas de Q-PCR de trigo. Con la dilución 1/5 se obtuvieron unos resultados casi idénticos con ambos sistemas (datos no mostrados). Sin embargo, durante el proceso de purificación se perdió mucha cantidad de ADN, dando lugar a unos rendimientos muy bajos, inferiores al 15% (datos no mostrados).

La dilución 1/5 del ADN extraído con el método *Wizard*[®] sin purificar es suficiente para los sistemas de Q-PCR basados en el fluoróforo SYBR[®] Green I. Sin embargo, si se quieren cuantificar los mismos extractos con el sistema de sondas TaqMan[®], es necesario aumentar la dilución por encima de 1/50 o purificar los extractos con columnas de afinidad, con la consecuente pérdida de sensibilidad o rendimiento (respectivamente). Por lo tanto, podemos concluir que alguno de los reactivos de extracción o ingredientes de los alimentos parece inhibir el sistema de sondas TaqMan[®] desarrollado. Por este motivo se ha descartado el uso de sondas TaqMan[®] en el análisis rutinario del ADN en alimentos para celíacos contaminados con gluten.

IV.10. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA “HOME-MADE” DE REACTIVOS DE Q-PCR

Hoy en día, los reactivos de amplificación para sistemas de Q-PCR basados en el SYBR[®] Green I se comercializan como kits “*ready-to-use*” (“listos para usar”). El objetivo de este estudio fue desarrollar y optimizar un sistema barato y universal de reactivos de Q-PCR, basado en el fluoróforo SYBR[®] Green I, que pudiera utilizarse como rutina en el laboratorio y que posteriormente pudiera venderse como alternativa a los productos comerciales existentes.

IV.10.1. Adición de aditivos/adyuvantes

El sistema comercial “*SYBR[®] Green PCR Core Reagents Kit*” (Applied Biosystems) contiene SYBR[®] Green I, ROX, MgCl₂, dNTPs, polimerasa AmpliTaq Gold[™] y UNG AmpErasa[®] ([Tabla III.3](#)), además de otros reactivos estabilizantes que la casa comercial mantiene en secreto.

Con objeto de estabilizar el sistema “*home-made*” de reactivos de Q-PCR (de forma que pueda ser utilizada durante un largo periodo de tiempo, sin merma en su rendimiento) se probaron distintos aditivos/adyuvantes descritos previamente en la bibliografía (como el glicerol, el DMSO, la BSA o el Triton[®] X-100). Tras su uso se mejoraron tanto la reproducibilidad como la eficiencia del sistema de amplificación de Q-PCR de trigo.

IV.10.2. Optimización de la concentración de SYBR[®] Green I

En el sistema comercial “SYBR[®] Green PCR Core Reagents Kit” (Applied Biosystems) los fluoróforos SYBR[®] Green I y ROX vienen incluidos en el tampón de PCR. Sin embargo, el SYBR[®] Green I se degrada a pHs superiores a 8,3 y los productos de degradación generados funcionan como potentes inhibidores de la PCR (Karsai *et al.*, 2002). Los pHs de tampones basados en TRIS (como los utilizados en PCR) son sensibles a los cambios de temperatura. Así, por ejemplo, un tampón TRIS con pH 8,0 a temperatura ambiente, aumentará hasta 8,5 si se almacena a 4°C. Este incremento es suficiente como para que las moléculas de SYBR[®] Green I se desestabilicen. Por este motivo, se decidió no incluir dicho fluoróforo en el tampón de PCR.

Aunque con la concentración 1x de SYBR[®] Green I se obtuvieron unos muy buenos resultados, también se probaron otras concentraciones (0,5x y 1,5x) con el objetivo de averiguar si este cambio afectaba a la cinética de reacción del sistema “*home-made*” de reactivos de Q-PCR (incluyendo los adyuvantes glicerol, DMSO, BSA y Triton[®] X-100). La concentración de SYBR[®] Green I no parecía tener efecto sobre la eficiencia de amplificación (datos no mostrados), por lo que se decidió utilizar la concentración más baja (0,5x).

IV.10.3. Optimización de la concentración de MgCl₂

En los sistemas de Q-PCR, la concentración de SYBR[®] Green I determina el nivel óptimo de MgCl₂ (Nath *et al.*, 2000). Por otro lado, la concentración de magnesio afecta a la hibridación de los *primers*, la especificidad del sistema y la actividad de la Taq polimerasa. Por todo ello, se decidió volver a optimizar la concentración de MgCl₂ del sistema individual de Q-PCR de trigo, utilizando SYBR[®] Green I 0,5x y los distintos adyuvantes (glicerol, DMSO, BSA y Triton[®] X-100). Se probaron concentraciones de MgCl₂ entre 2,5 y 4,0 mM. La disminución en la concentración de SYBR[®] Green I (de 1x a 0,5x) pareció no afectar a la concentración óptima de MgCl₂ (datos no mostrados). Por lo tanto, se decidió seguir utilizando la misma concentración que en el sistema comercial “SYBR[®] Green PCR Core Reagents Kit” (2,5 mM).

IV.10.4. Amplificación del ADN purificado de la variedad de trigo duro *Aldeano*

En la [Figura IV.40](#) se muestran las curvas de amplificación de las distintas diluciones seriadas del ADN purificado de la variedad de trigo duro *Aldeano*, utilizando el sistema desarrollado y optimizado de reactivos de Q-PCR ([apartado III.5.1.3](#)). Como se puede observar, tras ajustar el

umbral de detección o *threshold* a 0,2 unidades de fluorescencia (UF), se obtuvieron unos valores de C_T dos ciclos más bajos que los obtenidos con el sistema comercial de Applied Biosystems (**Tabla IV.6**). Sin embargo, esta disminución de ciclos no repercutió en un aumento de la sensibilidad del sistema, puesto que la desviación estándar de los replicados del punto más bajo de la curva (0,1 pg) fue muy superior a la obtenida con el sistema comercial de Applied Biosystems ($0,44 > 0,24$) y, por lo tanto, demasiado alta como para poder establecer 0,1 pg como límite de cuantificación (LOQ).

A pesar de que se utilizaron los mismos *primers* (W.F1 y W.R1), la temperatura de *melting*, disociación o fusión (T_m) del producto de amplificación disminuyó $2,5^\circ\text{C}$ respecto de la obtenida con el sistema comercial de Applied Biosystems (**Figura IV.40**, inserto). El cambio en los reactivos de Q-PCR podría explicar este hecho, puesto que la T_m no solo depende de las características del producto de amplificación (como su contenido en guanina-citosina, su longitud o su secuencia), sino también de la mezcla de reacción donde se encuentra disuelto.

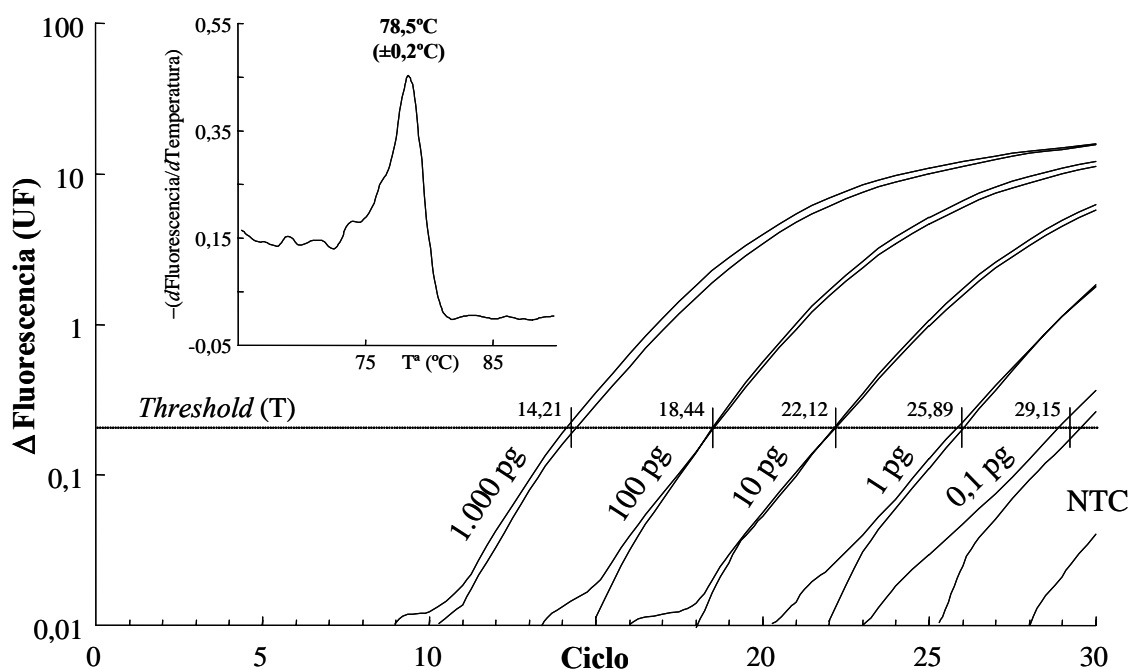


Figura IV.40 Curvas de amplificación de distintas cantidades de ADN purificado de la variedad de trigo duro *Aldeano*, utilizando el sistema “*home-made*” de reactivos de Q-PCR y los *primers* específicos de trigo W.F1 y W.R1. La línea del umbral de detección o *threshold* (T) se fijó en 0,2 UF. El inserto muestra la curva de disociación (o curva de *melting*) del producto de amplificación del punto de 10 pg, junto con su correspondiente temperatura de *melting*, disociación o fusión ($78,5^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$).

Se puede concluir que el sistema “*home-made*” de reactivos de Q-PCR desarrollado y optimizado en esta Tesis Doctoral proporciona una reproducibilidad, sensibilidad y eficiencia de amplificación comparables a las obtenidas con el sistema comercial “*SYBR[®] Green PCR Core Reagents Kit*” (Applied Biosystems). Por lo tanto, el nuevo protocolo de amplificación supone una alternativa económica a los caros kits “ready-to-use”.

IV.10.5. Estabilidad del sistema “*home-made*” de reactivos de Q-PCR

Con la ayuda del programa *ABI PRISM[®] 7000 SDS v1.1* se generó un gráfico con los logaritmos de las cantidades del ADN purificado de la variedad de trigo duro Aldeano y sus correspondientes valores de C_T ([Figura IV.41](#)).

La pendiente de la recta de regresión refleja la eficiencia del sistema. Con una eficiencia del 100%, la pendiente tiene un valor (absoluto) de 3,322, que son los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10. A medida que se pierde eficiencia, aumenta la pendiente y, por lo tanto, los ciclos de diferencia entre la C_T de un punto y su dilución 1/10.

Aplicando la fórmula $E (\%) = [10^{-(1/Pendiente)} - 1] \cdot 100$ (Watanabe *et al.*, 1991) con el sistema “*home-made*” de reactivos de Q-PCR recién desarrollado y optimizado ($t = 0$) se obtuvo una eficiencia del 85%, próxima al 89% del sistema comercial de Applied Biosystems ([Tabla IV.6](#)). Sin embargo, a medida que iba pasando el tiempo, la pendiente de la recta de regresión fue aumentando ([Figura IV.41](#)). Al cabo de cuatro meses, la eficiencia del sistema “*home-made*” de reactivos de Q-PCR había descendido hasta el 77%. La sensibilidad también se vio afectada, superando el punto de 0,1 pg los 30 ciclos de C_T .

El sistema “casero” de reactivos de Q-PCR desarrollado y optimizado en esta Tesis Doctoral proporciona una reproducibilidad, sensibilidad y eficiencia de amplificación comparables a las obtenidas con el sistema comercial “*SYBR[®] Green PCR Core Reagents Kit*” (Applied Biosystems). Sin embargo, dicho sistema fue perdiendo eficiencia y sensibilidad con el tiempo, dando lugar a unos resultados poco reproducibles. Como no se logró ni estabilizar el sistema ni averiguar que reactivo (o reactivos) era el responsable de dicha pérdida de eficiencia y sensibilidad, se decidió volver a utilizar el sistema comercial de Applied Biosystems, que proporcionaba unos resultados más reproducibles en el tiempo.

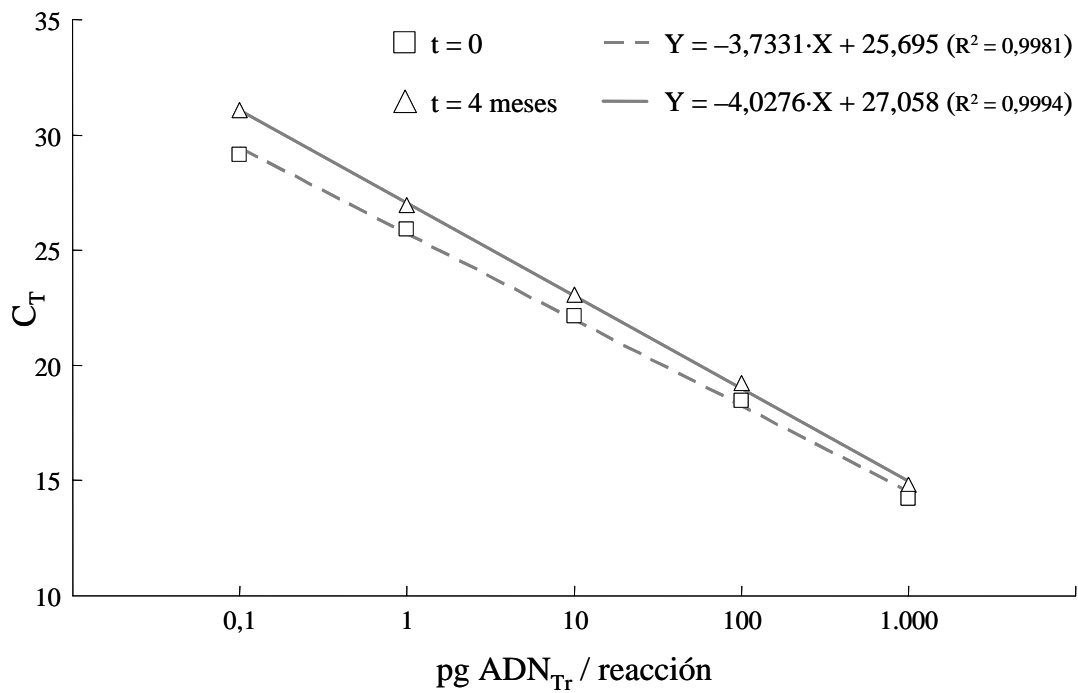


Figura IV.41 Rectas de regresión del sistema individual de Q-PCR de trigo calculadas a partir de distintas cantidades del ADN purificado de la variedad de trigo duro *Aldeano* ($\text{pg ADN}_{Tr} / \text{reacción}$) y de sus correspondientes valores de C_T (ciclos), utilizando el sistema "home-made" de reactivos de Q-PCR y los *primers* específicos de trigo **W.F1** y **W.R1**. Los cuadrados representan los valores obtenidos con el sistema "home-made" de reactivos de Q-PCR recién desarrollado y optimizado ($t = 0$), mientras que los triángulos representan los valores obtenidos tras 4 meses de trabajo ($t = 4$ meses). El eje de abscisas ($\text{pg ADN}_{Tr} / \text{reacción}$) está en escala logarítmica.

Capítulo V. Conclusiones

1. Se han desarrollado y optimizado tres sistemas individuales de detección y cuantificación de ADN de (i) *trigo*, (ii) *cebada* y (iii) *centeno* en alimentos “sin-gluten”, basados en la *PCR cuantitativa en tiempo-real (Q-PCR)* y el *SYBR[®] Green I*. Estos sistemas individuales de Q-PCR tienen una *sensibilidad* de **0,2 pg** de ADN de trigo, **1 pg** de ADN de cebada y **5 pg** de ADN de centeno.
2. Se ha desarrollado un sistema simultáneo de Q-PCR que permite detectar y cuantificar, en una misma reacción, el ADN procedente de los tres cereales tóxicos para los enfermos celíacos (trigo, cebada y centeno). Tiene una *sensibilidad* de **5 pg** de ADN, correspondiente a unos niveles de prolaminas de aproximadamente **5-10 ppm**.
3. Los productos de amplificación de los sistemas individuales de Q-PCR de trigo, cebada y centeno dan un único pico de disociación, con unas *temperaturas de melting (T_m)* de **81,0**, **76,8** y **79,2°C**, respectivamente.
4. El sistema simultáneo de Q-PCR permite discriminar el tipo de contaminación presente en los alimentos “sin-gluten” contaminados con trigo, cebada y centeno, en función de la T_m de los productos de amplificación: en el trigo y la cebada es de **72,0°C**, en el centeno es de **72,7°C**, y en las mezclas de estos tres cereales con más de un 33% de centeno, la T_m se encuentra entre **72,3** y **72,7°C**.
5. La suma de los valores de ADN de trigo, cebada y centeno cuantificados con los sistemas individuales de Q-PCR, se corresponde aceptablemente con el valor obtenido con el sistema simultáneo. De una manera similar al ELISA-R5, este sistema simultáneo se utiliza rutinariamente en la determinación de contaminaciones de trigo, cebada y centeno en alimentos “sin-gluten”.
6. Se han preparado tres *pooles* de ADN para los tres sistemas individuales de Q-PCR de trigo, cebada y centeno, a partir de los extractos purificados de 25 variedades de *trigo*, 14 variedades de *cebada* y 4 variedades de *centeno*, respectivamente. Los valores obtenidos de C_T fueron muy similares, con unas desviaciones estándar comprendidas entre 0,42 - 0,56 ciclos.
7. Se ha desarrollado y optimizado un sistema de extracción de ADN en alimentos *rápido* y con un alto *rendimiento*, basado en el método *Wizard[®]*. Este sistema proporciona un ADN de la suficiente *pureza* para ser utilizado directamente en los sistemas de Q-PCR, sin necesidad de un paso posterior de purificación.

8. Se ha puesto a punto un sistema de detección de ADN en geles de agarosa, para la visualización de los productos de amplificación de los cuatro sistemas de Q-PCR, basado en la adición de *SYBR[®] Green I* en el propio gel de agarosa, antes de que se enfríe y solidifique. El sistema es **4 veces** más sensible que los geles de agarosa teñidos con *bromuro de etidio*.
9. La resolución de los geles de agarosa permite diferenciar las bandas de ADN de los productos de amplificación de los sistemas individuales de Q-PCR de trigo, cebada y centeno (51, 61 y 67 pb, respectivamente). Sin embargo, los tamaños de los productos de amplificación del sistema simultáneo de Q-PCR son tan similares (80 pb para el trigo, 81 pb para la cebada y 78 pb para el centeno) que mediante electroforesis en geles de agarosa no se obtuvo una separación lo suficientemente resuelta como para poder llegar a diferenciarlos entre sí.
10. En los alimentos dietéticos para celíacos elaborados a partir de harinas de cereales “no tóxicos” (tipo maíz y/o arroz) y contaminados con gluten, el ADN de estos cereales, presente en altas concentraciones, no interfiere en la cuantificación del ADN de trigo, cebada y/o centeno, presente a niveles de *trazas*.
11. Los niveles del ADN parcialmente degradado de los alimentos “sin-gluten” *procesados con calor* pueden estar subestimados con los sistemas de Q-PCR, dependiendo del grado del tratamiento térmico.
12. Los cuatro sistemas de Q-PCR no detectan ADN en *alimentos hidrolizados y altamente procesados* (como las cervezas, los siropes, los extractos de malta, los cereales para el desayuno...) donde el ADN se encuentra masivamente degradado.
13. Los **componentes de la matriz** de los alimentos parecen no afectar a ninguno de los sistemas de Q-PCR basados en el fluoróforo *SYBR[®] Green I*. Sin embargo, cuando se utilizaron *sondas TaqMan[®]* con el sistema individual de Q-PCR de trigo, se observó que las matrices de ciertos alimentos interferían en la cuantificación del ADN, obteniéndose unos valores inferiores a los esperados.
14. Se ha observado una buena **correlación lineal** entre los niveles de *prolaminas* (cuantificados con el método de ELISA-R5) y los niveles de *ADN* de trigo, cebada y centeno (utilizando el sistema simultáneo de Q-PCR) en **alimentos no tratados con calor** y contaminados con trigo, cebada, centeno o mezclas de estos tres cereales.

15. Los resultados obtenidos en este estudio confirman que los sistemas de Q-PCR desarrollados pueden utilizarse como técnicas no-inmunológicas *complementarias* al método de ELISA-R5 para confirmar la presencia o ausencia de contaminaciones de trigo, cebada y/o centeno en alimentos “sin-gluten”.

Capítulo VI. Bibliografía

- Abu Al-Soud, W. & Radstrom, P. (1998) Capacity of nine thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol* 64(10), 3748-53.
- Agardh, D., Nilsson, A., Carlsson, A., Kockum, I., Lernmark, A. & Ivarsson, S.A. (2002) Tissue transglutaminase autoantibodies and human leucocyte antigen in Down's syndrome patients with coeliac disease. *Acta Paediatr* 91(1), 34-8.
- Alary, R., Serin, A., Duviau, M.P., Joudrier, P. & Gautier, M.F. (2002) Quantification of common wheat adulteration of durum wheat pasta using real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). *Cereal Chemistry* 79(4), 553-558.
- Altenbach, S.B. (1998) Quantification of individual low-molecular-weight glutenin subunit transcripts in developing wheat grains by competitive RT-PCR. *Theoretical and Applied Genetics* 97(3), 413-421.
- Anderson, R.P., Degano, P., Godkin, A.J., Jewell, D.P. & Hill, A.V. (2000) In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med* 6(3), 337-42.
- Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Molberg, O., Scott, H., Koning, F., Jung, G., Roepstorff, P., Lundin, K.E. & Sollid, L.M. (2004) The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med* 1(1), e1.
- Arentz-Hansen, H., Korner, R., Molberg, O., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y.M., Lundin, K.E., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L.M. & McAdam, S.N. (2000) The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* 191(4), 603-12.
- Arlorio, M., Coisson, J.D., Cereti, E., Travaglia, F., Capasso, M. & Martelli, A. (2003) Polymerase chain reaction (PCR) of puroindoline b and ribosomal/puroindoline b multiplex PCR for the detection of common wheat (*Triticum aestivum*) in Italian pasta. *European Food Research and Technology* 216(3), 253-258.
- Arnal, C., Ferre-Aubineau, V., Mignotte, B., Imbert-Marcille, B.M. & Billaudel, S. (1999) Quantification of hepatitis A virus in shellfish by competitive reverse transcription-PCR with coextraction of standard RNA. *Appl Environ Microbiol* 65(1), 322-6.

- Arranz, E., Telleria, J.J., Sanz, A., Martin, J.F., Alonso, M., Calvo, C. & Blanco-Quiros, A. (1997) HLA-DQA1*0501 and DQB1*02 homozygosity and disease susceptibility in Spanish coeliac patients. *Exp Clin Immunogenet* 14(4), 286-90.
- Arumuganathan, K. & Earle, E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9, 208-18.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struth, K. (2002) *Current protocols in molecular biology*. Greene Pub. Associates & Wiley-Interscience.
- Balas, A., Vicario, J.L., Zambrano, A., Acuna, D. & Garcia-Novo, D. (1997) Absolute linkage of coeliac disease and dermatitis herpetiformis to HLA-DQ. *Tissue Antigens* 50(1), 52-6.
- Baldas, V., Tommasini, A., Trevisiol, C., Berti, I., Fasano, A., Sblattero, D., Bradbury, A., Marzari, R., Barillari, G., Ventura, A. & Not, T. (2000) Development of a novel rapid non-invasive screening test for coeliac disease. *Gut* 47(5), 628-31.
- Barker, R.F., Harberd, N.P., Jarvis, M.G. & Flavell, R.B. (1988) Structure and evolution of the intergenic region in a ribosomal DNA repeat unit of wheat. *J Mol Biol* 201(1), 1-17.
- Baurens, F.C., Noyer, J.L., Lanaud, C. & Lagoda, P.J. (1996) Use of competitive PCR to assay copy number of repetitive elements in banana. *Mol Gen Genet* 253(1-2), 57-64.
- Becker-Andre, M. & Hahlbrock, K. (1989) Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res* 17(22), 9437-46.
- Bellin, T., Pulz, M., Matussek, A., Hempen, H.G. & Gunzer, F. (2001) Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *J Clin Microbiol* 39(1), 370-4.
- Benini, L., Sembenini, C., Salandini, L., Dall, O.E., Bonfante, F. & Vantini, I. (2001) Gastric emptying of realistic meals with and without gluten in patients with coeliac disease. Effect of jejunal mucosal recovery. *Scand J Gastroenterol* 36(10), 1044-8.

- Bietz, J.A., Shepherd, K.W. & Wall, J.S. (1975) Single-Kernel Analysis of Glutenin - Use in Wheat Genetics and Breeding. *Cereal Chemistry* 52(4), 513-532.
- Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H. & Marky, L.A. (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(11), 3746-50.
- Brichacek, B. & Stevenson, M. (1997) Quantitative competitive RNA PCR for quantitation of virion-associated HIV-1 RNA. *Methods* 12(4), 294-9.
- Brodmann, P., Eugster, A., Hübner, P., Meyer, R., Pauli, U., Vögeli, U. & Lüthy, J. (1997) Detection of the genetically engineered Roundup Ready soybeans using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *Mitt Gebiete Lebensm Hyg* 88, 722-31.
- Brodmann, P.D., Ilg, E.C., Berthoud, H. & Herrmann, A. (2002) Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. *J AOAC Int* 85(3), 646-53.
- Bryan, G.J., Dixon, A., Gale, M.D. & Wiseman, G. (1998) A PCR-based method for the detection of hexaploid bread wheat adulteration of durum wheat and pasta. *Journal of Cereal Science* 28(2), 135-145.
- Burgin-Wolff, A., Gaze, H., Hadziselimovic, F., Huber, H., Lentze, M.J., Nussle, D. & Reymond-Berthet, C. (1991) Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch Dis Child* 66(8), 941-7.
- Burgin-Wolff, A., Petersson, C.J., Hadziselimovic, F. & Dahlbom, I. (2001) Anti human tissue transglutaminase IgA antibodies versus endomysium antibodies for monitoring and diagnosis of coeliac disease. In 34th Annual ESPGHAN Meeting Génova (Italia).
- Calabuig, M., Torregosa, R., Polo, P., Tuset, L., Tomas, C., Alvarez, V., Garcia-Vila, A., Brines, J., Vilar, P., Farre, C. & et al. (1990) Serological markers and celiac disease: a new diagnostic approach? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 10(4), 435-42.
- Calero, P., Ribes, C., Albiach, V., Carles, C. & Ferrer, J. (1996) IgA antigliadin antibodies as a screening method for nonovert celiac disease in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 23(1), 29-33.

- Camafeita, E., Alfonso, P., Acevedo, B. & Mendez, E. (1997a) Sample preparation optimization for the analysis of gliadins in food by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 32(4), 444-449.
- Camafeita, E., Alfonso, P., Mothes, T. & Mendez, E. (1997b) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric micro-analysis: the first non-immunological alternative attempt to quantify gluten gliadins in food samples. *J Mass Spectrom* 32(9), 940-7.
- Camafeita, E. & Mendez, E. (1998) Screening of gluten avenins in foods by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 33(10), 1023-8.
- Camafeita, E., Solis, J., Alfonso, P., Lopez, J.A., Sorell, L. & Mendez, E. (1998) Selective identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of different types of gluten in foods made with cereal mixtures. *J Chromatogr A* 823(1-2), 299-306.
- Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., De Vitis, I., Pianelli, G., Gesuita, R., Carle, F., Mandolesi, A., Bearzi, I. & Fasano, A. (2007) A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr* 85(1), 160-6.
- Collin, P., Thorell, L., Kaukinen, K. & Maki, M. (2004) The safe threshold for gluten contamination in gluten-free products. Can trace amounts be accepted in the treatment of coeliac disease? *Aliment Pharmacol Ther* 19(12), 1277-83.
- Cross, N.C. (1995) Quantitative PCR techniques and applications. *Br J Haematol* 89(4), 693-7.
- Choi, K., Siegel, M., Piper, J.L., Yuan, L., Cho, E., Strnad, P., Omary, B., Rich, K.M. & Khosla, C. (2005) Chemistry and biology of dihydroisoxazole derivatives: selective inhibitors of human transglutaminase 2. *Chem Biol* 12(4), 469-75.
- Chorzelski, T.P., Beutner, E.H., Sulej, J., Tchorzewska, H., Jablonska, S., Kumar, V. & Kapuscinska, A. (1984) IgA anti-endomysium antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Br J Dermatol* 111(4), 395-402.

- Dahinden, I., von Buren, M. & Luthy, J. (2001) A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *European Food Research and Technology* 212(2), 228-233.
- de Lecea, A., Ribes, C., Polanco, I. & Calvete, J.F. (1996) Serological screening (antigliadin and antiendomysium antibodies) for non-overt coeliac disease in children of short stature. *Acta Paediatr Suppl* 412, 54-5.
- Demeke, T. & Adams, R.P. (1992) The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques* 12(3), 332-4.
- Deng, G., Yu, M. & Smith, H.S. (1993) An improved method of competitive PCR for quantitation of gene copy number. *Nucleic Acids Res* 21(20), 4848-9.
- Dewar, D.H., Amato, M., Ellis, H.J., Pollock, E.L., Gonzalez-Cinca, N., Wieser, H. & Ciclitira, P.J. (2006) The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18(5), 483-91.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Auricchio, S., Greco, L., Clarke, C., De Vincenzi, M., Giovannini, C., D'Archivio, M., Landolfo, F., Parrilli, G., Minervini, F., Arendt, E. & Gobbetti, M. (2004) Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl Environ Microbiol* 70(2), 1088-96.
- Dickey, W., McMillan, S.A., McCrum, E.E. & Evans, A.E. (1997) Association between serum levels of total IgA and IgA class endomysial and antigliadin antibodies: implications for coeliac disease screening. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9(6), 559-62.
- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E.O. & Schuppan, D. (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 3(7), 797-801.
- Dieterich, W., Laag, E., Schopper, H., Volta, U., Ferguson, A., Gillett, H., Riecken, E.O. & Schuppan, D. (1998) Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology* 115(6), 1317-21.

- Dostal, D.E., Rothblum, K.N. & Baker, K.M. (1994) An improved method for absolute quantification of mRNA using multiplex polymerase chain reaction: determination of renin and angiotensinogen mRNA levels in various tissues. *Anal Biochem* 223(2), 239-50.
- Felske, A., Akkermans, A.D. & De Vos, W.M. (1998) Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl Environ Microbiol* 64(11), 4581-7.
- Ferguson, A., Arranz, E. & O'Mahony, S. (1993) Clinical and pathological spectrum of coeliac disease--active, silent, latent, potential. *Gut* 34(2), 150-1.
- Fernandez-Arquero, M., Caldes, T., Casado, E., Maluenda, C., Figueredo, M.A. & De La Concha, E.G. (1998) Polymorphism within the HLA-DQB1*02 promoter associated with susceptibility to coeliac disease. *Eur J Immunogenet* 25(1), 1-3.
- Fernandez, E., Riestra, S., Rodrigo, L., Blanco, C., Lopez-Vazquez, A., Fuentes, D., Moreno, M. & Lopez-Larrea, C. (2005) Comparison of six human anti-transglutaminase ELISA-tests in the diagnosis of celiac disease in the Saharawi population. *World J Gastroenterol* 11(24), 3762-6.
- Ferre, F. (1992) Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl* 2(1), 1-9.
- Ferre, S., García, E. & Méndez, E. (2003) Measurement of hydrolysed gliadins by competitive ELISA based on monoclonal antibody R5: analysis of syrups and beers. In 18th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity, pp. 65-70. Edited by M. Stern. Estocolmo (Suecia): Verlag Wissenschaftliche Scripten (Zwickau, Alemania).
- Ferre, S., Ribes, C., Genzor, C., Gamen, S., Pena, L., Ortigosa, L. & Mendez, E. (2004) Immunochromatographic sticks for tissue transglutaminase and antigliadin antibody screening in celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2(6), 480-4.
- Freeman, W.M., Walker, S.J. & Vrana, K.E. (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26(1), 112-22, 124-5.
- García, E., Hernando, A., Toribio, T., Genzor, C. & Méndez, E. (2001) Test immunochromatographic rapid assay: A rapid, highly-sensitive and semi-quantitative test

- for the detection of gluten in foodstuffs. In 16th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity, pp. 55-64. Edited by M. Stern. Sitges (España): Verlag Wissenschaftliche Scripten (Zwickau, Alemania).
- Garcia, E., Llorente, M., Hernando, A., Kieffer, R., Wieser, H. & Mendez, E. (2005) Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17(5), 529-39.
- Garrote, J.A., Sorell, L., Alfonso, P., Acevedo, B., Ortigosa, L., Ribes-Koninckx, C., Gavalondo, J. & Mendez, E. (1999) A novel visual immunoassay for coeliac disease screening. *Eur J Clin Invest* 29(8), 697-9.
- Gawienowski, M.C., Eckhoff, S.R., Yang, P., Rayapati, P.J., Binder, T. & Briskin, D.P. (1999) Fate of maize DNA during steeping, wet-milling, and processing. *Cereal Chemistry* 76(3), 371-374.
- Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K. & Bunn, H.F. (1990) Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(7), 2725-9.
- Grassi, G., Zentilin, L., Tafuro, S., Diviacco, S., Ventura, A., Falaschi, A. & Giacca, M. (1994) A rapid procedure for the quantitation of low abundance RNAs by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 22(21), 4547-9.
- Grodzinsky, E., Jansson, G., Skogh, T., Stenhammar, L. & Falth-Magnusson, K. (1995) Anti-endomysium and anti-gliadin antibodies as serological markers for coeliac disease in childhood: a clinical study to develop a practical routine. *Acta Paediatr* 84(3), 294-8.
- Hardegger, M., Brodmann, P. & Herrmann, A. (1999) Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *Eur Food Res Technol* 209, 83-7.
- Hardman, C.M., Garioch, J.J., Leonard, J.N., Thomas, H.J., Walker, M.M., Lortan, J.E., Lister, A. & Fry, L. (1997) Absence of toxicity of oats in patients with dermatitis herpetiformis. *N Engl J Med* 337(26), 1884-7.

- Hassan-Hauser, C., Mayer, W. & Hortner, H. (1998) Detection of the starch modifying gbss-antisense construct in transgenic potatoes. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 206(2), 83-87.
- Hausch, F., Shan, L., Santiago, N.A., Gray, G.M. & Khosla, C. (2002) Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(4), G996-G1003.
- Henterich, N., Osman, A.A., Mendez, E. & Mothes, T. (2003) Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction. *Nahrung* 47(5), 345-8.
- Hernandez, M., Duplan, M.N., Berthier, G., Vaitilingom, M., Hauser, W., Freyer, R., Pla, M. & Bertheau, Y. (2004) Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *J Agric Food Chem* 52(15), 4632-7.
- Hernandez, M., Esteve, T. & Pla, M. (2005) Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower, and wheat. *J Agric Food Chem* 53(18), 7003-9.
- Hernandez, M., Rio, A., Esteve, T., Prat, S. & Pla, M. (2001) A rapeseed-specific gene, acetyl-CoA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. *J Agric Food Chem* 49(8), 3622-7.
- Hernando, A., Garcia, E., Llorente, M., Mujico, J.R., Lombardía, M., Mäki, M., Kaukinen, K., Collin, P. & Méndez, E. (2004) Measurement of hydrolysed gliadins in malts, breakfast cereals, heated/hydrolysed foods, whiskies and beers by means of a new competitive R5 ELISA. In 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity, pp. 31-7. Edited by M. Stern. Praga (República Checa): Verlag Wissenschaftliche Scripten (Zwickau, Alemania).
- Hernando, A., Valdes, I. & Mendez, E. (2003) New strategy for the determination of gliadins in maize- or rice-based foods matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: fractionation of gliadins from maize or rice prolamins by acidic treatment. *J Mass Spectrom* 38(8), 862-71.

- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. & Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10(4), 413-7.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11(9), 1026-30.
- Higuchi, R. & Watson, R. (1999) PCR amplifications. In *Protocols for functional genomics*. Edited by M.A. Innis, D.H. Gelfand & J.J. Snisky. Academic Press.
- Hoef, A.M., Kok, E.J., Bouw, E., Kuiper, H.A. & Keijer, J. (1998) Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. *Food Addit Contam* 15(7), 767-74.
- Hoffenberg, E.J., Haas, J., Drescher, A., Barnhurst, R., Osberg, I., Bao, F. & Eisenbarth, G. (2000) A trial of oats in children with newly diagnosed celiac disease. *J Pediatr* 137(3), 361-6.
- Hogberg, L., Laurin, P., Falth-Magnusson, K., Grant, C., Grodzinsky, E., Jansson, G., Ascher, H., Browaldh, L., Hammersjo, J.A., Lindberg, E., Myrdal, U. & Stenhammar, L. (2004) Oats to children with newly diagnosed coeliac disease: a randomised double blind study. *Gut* 53(5), 649-54.
- Höhne, M., Satisi, C.R. & Meyer, R. (2002) Real-time multiplex PCR: An accurate method for the detection and quantification of 35-CaMV promoter in genetically modified maize-containing food. *Eur Food Res Technol* 215, 59-64.
- Holden, M.J., Blasic, J.R., Jr., Bussjaeger, L., Kao, C., Shokere, L.A., Kendall, D.C., Freese, L. & Jenkins, G.R. (2003) Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. *J Agric Food Chem* 51(9), 2468-74.
- Holm, K., Maki, M., Vuolteenaho, N., Mustalahti, K., Ashorn, M., Ruuska, T. & Kaukinen, K. (2006) Oats in the treatment of childhood coeliac disease: a 2-year controlled trial and a long-term clinical follow-up study. *Aliment Pharmacol Ther* 23(10), 1463-72.
- Holm, K., Vuolteenaho, N. & Mäki, M. (1998) No harm of oats in the diet of children with newly or previously diagnosed coeliac disease (CD). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 26, 549.

- Holmes, G.K. (1996) Non-malignant complications of coeliac disease. *Acta Paediatr Suppl* 412, 68-75.
- Holst-Jensen, A. & Berdal, K.G. (2004) The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. *J AOAC Int* 87(4), 927-36.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. & Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16), 7276-80.
- Hotzel, H., Muller, W. & Sachse, K. (1999) Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients. *European Food Research and Technology* 209(3-4), 192-196.
- Hubner, P., Studer, E. & Luthy, J. (1999) Quantitation of genetically modified organisms in food. *Nat Biotechnol* 17(11), 1137-8.
- Hubner, P., Waiblinger, H.U., Pietsch, K. & Brodmann, P. (2001) Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J AOAC Int* 84(6), 1855-64.
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K. & Engel, K.H. (1997) Detection of genetically modified insect-resistant Bt maize by means of polymerase chain reaction. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 205(6), 442-445.
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K. & Engel, K.H. (1998) Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 206(3), 203-207.
- Hupfer, C., Mayer, J., Hotzel, H., Sachse, K. & Engel, K.H. (1999) The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize. *Eur Food Res Technol* 209, 301-4.
- Janatuinen, E.K., Kempainen, T.A., Julkunen, R.J., Kosma, V.M., Maki, M., Heikkinen, M. & Uusitupa, M.I. (2002) No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut* 50(3), 332-5.

- Janatuinen, E.K., Kemppainen, T.A., Pikkarainen, P.H., Holm, K.H., Kosma, V.M., Uusitupa, M.I., Maki, M. & Julkunen, R.J. (2000) Lack of cellular and humoral immunological responses to oats in adults with coeliac disease. *Gut* 46(3), 327-31.
- Janatuinen, E.K., Pikkarainen, P.H., Kemppainen, T.A., Kosma, V.M., Jarvinen, R.M., Uusitupa, M.I. & Julkunen, R.J. (1995) A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease. *N Engl J Med* 333(16), 1033-7.
- Janssen, F.W., Hagele, G.H. & van Triest, M. (1998) Contamination of rolled oats with wheat, rye and barley. In 13th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity, pp. 29-35. Edited by M. Stern. Barcelona (España): Verlag Wissenschaftliche Scripten (Zwickau, Alemania).
- Johnsen, K., Enger, O., Jacobsen, C.S., Thirup, L. & Torsvik, V. (1999) Quantitative selective PCR of 16S ribosomal DNA correlates well with selective agar plating in describing population dynamics of indigenous *Pseudomonas* spp. in soil hot spots. *Appl Environ Microbiol* 65(4), 1786-8.
- Kahlenberg, F., Méndez, E. & Mothes, T. (2003) Epitope specificity of monoclonal antibody R5. In 17th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity, pp. 71-8. Edited by M. Stern. Estocolmo (Suecia): Verlag Wissenschaftliche Scripten (Zwickau, Alemania).
- Kahlenberg, F., Sanchez, D., Lachmann, I., Tuckova, L., Tlaskalova, H., Mendez, E. & Mothes, T. (2006) Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. *European Food Research and Technology* 222(1-2), 78-82.
- Karsai, A., Muller, S., Platz, S. & Hauser, M.T. (2002) Evaluation of a homemade SYBR green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques* 32(4), 790-2, 794-6.
- Khvyrleva Ts, D., Gazumian, A.K. & Anan'ev, E.V. (1988) [Organization and primary nucleotide sequence of 5S rRNA genes in barley *Hordeum vulgare*]. *Genetika* 24(10), 1830-40.
- Kim, S., Labbe, R.G. & Ryu, S. (2000) Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol* 66(3), 1213-5.

- Kolho, K.L. & Savilahti, E. (1997) IgA endomysium antibodies on human umbilical cord: an excellent diagnostic tool for celiac disease in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24(5), 563-7.
- Koppel, E., Stadler, M., Luthy, J. & Hubner, P. (1998) Detection of wheat contamination in oats by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 206(6), 399-403.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362(6422), 709-15.
- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G. & Anklam, E. (2001) Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research and Technology* 212(4), 497-504.
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., Anklam, E., Borchers, T., Braunschweiger, G., Busch, U., Eklund, E., Eriksen, F.D., Fagan, J., Fellingner, A., Gaugitsch, H., Hayes, D., Hertel, C., Hortner, H., Joudrier, P., Kruse, L., Meyer, R., Miraglia, M., Muller, W., Phillipp, P., Popping, B., Rentsch, R., Wurtz, A. & et al. (1999) IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *J AOAC Int* 82(4), 923-8.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W. & Deetz, K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4(6), 357-62.
- Lockey, C., Otto, E. & Long, Z. (1998) Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques* 24(5), 744-6.
- Lundin, K.E., Gjertsen, H.A., Scott, H., Sollid, L.M. & Thorsby, E. (1994) Function of DQ2 and DQ8 as HLA susceptibility molecules in celiac disease. *Hum Immunol* 41(1), 24-7.
- Lundin, K.E., Nilsen, E.M., Scott, H.G., Loberg, E.M., Gjoen, A., Bratlie, J., Skar, V., Mendez, E., Lovik, A. & Kett, K. (2003) Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut* 52(11), 1649-52.

- Lundin, K.E., Scott, H., Hansen, T., Paulsen, G., Halstensen, T.S., Fausa, O., Thorsby, E. & Sollid, L.M. (1993) Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* 178(1), 187-96.
- Lundin, K.E., Sollid, L.M., Qvigstad, E., Markussen, G., Gjertsen, H.A., Ek, J. & Thorsby, E. (1990) T lymphocyte recognition of a celiac disease-associated cis- or trans-encoded HLA-DQ alpha/beta-heterodimer. *J Immunol* 145(1), 136-9.
- Lyamichev, V., Brow, M.A. & Dahlberg, J.E. (1993) Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 260(5109), 778-83.
- Llanes, S., Calero, P., Hernandez, M. & Ribes, C. (1997) Anticuerpos antiendomiso sobre cordón umbilical (AAE-CUH) como test serológico confirmatorio en el diagnóstico de la enfermedad celiaca. *An Esp Ped* 95, 61.
- Macritchie, F. & Lafiandra, D. (1997) Structure-function relationships of wheat proteins. In *Food Proteins and their Applications*, pp. 293-324. Edited by S. Damodaran & A. Paraf. Marcel Dekker Inc.
- Maki, M. (1995) The humoral immune system in coeliac disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 9(2), 231-49.
- Maki, M., Hallstrom, O., Vesikari, T. & Visakorpi, J.K. (1984) Evaluation of a serum IgA-class reticulín antibody test for the detection of childhood celiac disease. *J Pediatr* 105(6), 901-5.
- Maki, M., Kallonen, K., Lahdeaho, M.L. & Visakorpi, J.K. (1988) Changing pattern of childhood coeliac disease in Finland. *Acta Paediatr Scand* 77(3), 408-12.
- Marsh, M.N. (1992) Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 102(1), 330-54.
- Marti, T., Molberg, O., Li, Q., Gray, G.M., Khosla, C. & Sollid, L.M. (2005) Prolyl endopeptidase-mediated destruction of T cell epitopes in whole gluten: chemical and immunological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 312(1), 19-26.

- McCulloch, R.K., Choong, C.S. & Hurley, D.M. (1995) An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR. *PCR Methods Appl* 4(4), 219-26.
- Meeuwiss.Gw (1970) Diagnostic Criteria in Coeliac Disease. *Acta Paediatrica Scandinavica* 59(4), 461-&.
- Mendez, E., Valdes, I. & Camafeita, E. (2000) Analysis of gluten in foods by MALDI-TOFMS. *Methods Mol Biol* 146, 355-67.
- Mendez, E., Vela, C., Immer, U. & Janssen, F.W. (2005) Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17(10), 1053-63.
- Meyer, R. (1999) Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10(6), 391-399.
- Meyer, R., Candrian, U. & Luthy, J. (1994) Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *J AOAC Int* 77(3), 617-22.
- Meyer, R., Chardonens, F., Hubner, P. & Luthy, J. (1996) Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z Lebensm Unters Forsch* 203(4), 339-44.
- Molberg, O., McAdam, S., Lundin, K.E., Kristiansen, C., Arentz-Hansen, H., Kett, K. & Sollid, L.M. (2001) T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *Eur J Immunol* 31(5), 1317-23.
- Molberg, O., McAdam, S.N., Korner, R., Quarsten, H., Kristiansen, C., Madsen, L., Fugger, L., Scott, H., Noren, O., Roepstorff, P., Lundin, K.E., Sjostrom, H. & Sollid, L.M. (1998) Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 4(6), 713-7.
- Molberg, O., McAdam, S.N. & Sollid, L.M. (2000) Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30(3), 232-40.

- Molberg, O., Solheim Flaete, N., Jensen, T., Lundin, K.E., Arentz-Hansen, H., Anderson, O.D., Kjersti Uhlen, A. & Sollid, L.M. (2003) Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology* 125(2), 337-44.
- Moller, A. & Jansson, J.K. (1997) Quantification of genetically tagged cyanobacteria in Baltic Sea sediment by competitive PCR. *Biotechniques* 22(3), 512-8.
- Morrison, T.B., Weis, J.J. & Wittwer, C.T. (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24(6), 954-8, 960, 962.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-50.
- Murray, M.G. & Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8(19), 4321-5.
- Nath, K., Sarosy, J.W., Hahn, J. & Di Como, C.J. (2000) Effects of ethidium bromide and SYBR Green I on different polymerase chain reaction systems. *J Biochem Biophys Methods* 42(1-2), 15-29.
- Osman, A.A., Uhlig, H.H., Valdes, I., Amin, M., Mendez, E. & Mothes, T. (2001) A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13(10), 1189-93.
- Paabo, S. (1989) Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(6), 1939-43.
- Paabo, S., Higuchi, R.G. & Wilson, A.C. (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *J Biol Chem* 264(17), 9709-12.
- Pardigol, A., Guillet, S. & Pöpping, B. (2003) A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. *Eur Food Res Technol* 216, 412-20.
- Pauli, U., Liniger, M. & Zimmermann, A. (1998) Detection of DNA in soybean oil. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 207(4), 264-267.

- Payne, P.I., Corfield, K.G. & Blackman, J.A. (1979) Identification of a High-Molecular-Weight Subunit of Glutenin Whose Presence Correlates with Bread-Making Quality in Wheats of Related Pedigree. *Theoretical and Applied Genetics* 55(3-4), 153-159.
- Peña, A.S., Garrote, J.A. & Crusius, J.B. (1998) Advances in the immunogenetics of coeliac disease. Clues for understanding the pathogenesis and disease heterogeneity. *Scand J Gastroenterol Suppl* 225, 56-8.
- Peraaho, M., Kaukinen, K., Mustalahti, K., Vuolteenaho, N., Maki, M., Laippala, P. & Collin, P. (2004) Effect of an oats-containing gluten-free diet on symptoms and quality of life in coeliac disease. A randomized study. *Scand J Gastroenterol* 39(1), 27-31.
- Piatak, M., Jr., Luk, K.C., Williams, B. & Lifson, J.D. (1993a) Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques* 14(1), 70-81.
- Piatak, M., Jr., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M. & Lifson, J.D. (1993b) High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259(5102), 1749-54.
- Piper, J.L., Gray, G.M. & Khosla, C. (2004) Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 311(1), 213-9.
- Ploski, R., Ek, J., Thorsby, E. & Sollid, L.M. (1993) On the HLA-DQ(alpha 1*0501, beta 1*0201)-associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1*0201. *Tissue Antigens* 41(4), 173-7.
- Polvi, A., Arranz, E., Fernandez-Arquero, M., Collin, P., Maki, M., Sanz, A., Calvo, C., Maluenda, C., Westman, P., de la Concha, E.G. & Partanen, J. (1998) HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol* 59(3), 169-75.
- Raeymakers, L. (1993) Quantitative PCR: Theoretical considerations with practical implications. *Anal Biochem* 214, 582-5.
- Raivio, T., Kaukinen, K., Nemes, E., Laurila, K., Collin, P., Kovacs, J.B., Maki, M. & Korponay-Szabo, I.R. (2006) Self transglutaminase-based rapid coeliac disease antibody detection by a lateral flow method. *Aliment Pharmacol Ther* 24(1), 147-54.

- Retama, S. (1997) Tef. *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Roma: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research.
- Reunala, T., Collin, P., Holm, K., Pikkarainen, P., Miettinen, A., Vuolteenaho, N. & Maki, M. (1998) Tolerance to oats in dermatitis herpetiformis. *Gut* 43(4), 490-3.
- Ribes, C., Giliams, J.P., Polanco, I. & Pena, A.S. (1984) IgA antigliadin antibodies in celiac and inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 3(5), 676-82.
- Ribes, C., Llanes, S., Calero, P. & Hernandez, M. (1999) ¿Es la transglutaminasa la solución definitiva? *An Esp Ped* 126, 55.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P. & Wittwer, C.T. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245(2), 154-60.
- Rodrigo, L. (2006) Celiac disease. *World J Gastroenterol* 12(41), 6585-93.
- Ronning, S.B., Berdal, K.G., Andersen, C.B. & Holst-Jensen, A. (2006) Novel reference gene, PKABA1, used in a duplex real-time polymerase chain reaction for detection and quantitation of wheat- and barley-derived DNA. *J Agric Food Chem* 54(3), 682-7.
- Rostom, A., Dube, C., Cranney, A., Saloojee, N., Sy, R., Garritty, C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., Pan, I., MacNeil, J., Mack, D., Patel, D. & Moher, D. (2005) The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology* 128(4 Suppl 1), S38-46.
- Rye, H.S., Dabora, J.M., Quesada, M.A., Mathies, R.A. & Glazer, A.N. (1993) Fluorometric assay using dimeric dyes for double- and single-stranded DNA and RNA with picogram sensitivity. *Anal Biochem* 208(1), 144-50.
- Rye, H.S., Yue, S., Wemmer, D.E., Quesada, M.A., Haugland, R.P., Mathies, R.A. & Glazer, A.N. (1992) Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications. *Nucleic Acids Res* 20(11), 2803-12.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839), 487-91.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732), 1350-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandberg, M., Lundberg, L., Ferm, M. & Yman, I.M. (2003) Real Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *European Food Research and Technology* 217(4), 344-349.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F. & Zeillinger, R. (1995) Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl* 4(4), 234-8.
- Schnerr, H., Niessen, L. & Vogel, R.F. (2001) Real time detection of the *trt5* gene in *Fusarium* species by lightcycler-PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring. *Int J Food Microbiol* 71(1), 53-61.
- Seah, P.P., Fry, L., Rossiter, M.A., Hoffbrand, A.V. & Holborow, E.J. (1971) Anti-reticulin antibodies in childhood coeliac disease. *Lancet* 2(7726), 681-2.
- Searle, M.S. & Embrey, K.J. (1990) Sequence-specific interaction of Hoechst 33258 with the minor groove of an adenine-tract DNA duplex studied in solution by ¹H NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Res* 18(13), 3753-62.
- Shan, L., Marti, T., Sollid, L.M., Gray, G.M. & Khosla, C. (2004) Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem J* 383(Pt 2), 311-8.
- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M. & Khosla, C. (2002) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297(5590), 2275-9.

- Sharma, V.K. & Carlson, S.A. (2000) Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. *Appl Environ Microbiol* 66(12), 5472-6.
- Siebert, P.D. & Larrick, J.W. (1992) Competitive PCR. *Nature* 359(6395), 557-8.
- Sjostrom, H., Lundin, K.E., Molberg, O., Korner, R., McAdam, S.N., Anthonsen, D., Quarsten, H., Noren, O., Roepstorff, P., Thorsby, E. & Sollid, L.M. (1998) Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand J Immunol* 48(2), 111-5.
- Skerritt, J.H. & Hill, A.S. (1991) Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 74(2), 257-64.
- Sollid, L.M., Molberg, O., McAdam, S. & Lundin, K.E. (1997) Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase--guilt by association? *Gut* 41(6), 851-2.
- Sollid, L.M. & Thorsby, E. (1993) HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 105(3), 910-22.
- Sorell, L., Garrote, J.A., Acevedo, B. & Arranz, E. (2002) One-step immunochromatographic assay for screening of coeliac disease. *Lancet* 359(9310), 945-6.
- Sorell, L., Lopez, J.A., Valdes, I., Alfonso, P., Camafeita, E., Acevedo, B., Chirido, F., Gavalondo, J. & Mendez, E. (1998) An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Lett* 439(1-2), 46-50.
- Southan, M. & MacRitchie, F. (1999) Molecular weight distribution of wheat proteins. *Cereal Chemistry* 76(6), 827-836.
- Spaenij-Dekking, L., Kooy-Winkelaar, Y. & Koning, F. (2005a) The Ethiopian cereal tef in celiac disease. *N Engl J Med* 353(16), 1748-9.
- Spaenij-Dekking, L., Kooy-Winkelaar, Y., van Veelen, P., Drijfhout, J.W., Jonker, H., van Soest, L., Smulders, M.J., Bosch, D., Gilissen, L.J. & Koning, F. (2005b) Natural variation in toxicity of wheat: potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients. *Gastroenterology* 129(3), 797-806.

- Spurkland, A., Sollid, L.M., Ronningen, K.S., Bosnes, V., Ek, J., Vartdal, F. & Thorsby, E. (1990) Susceptibility to develop celiac disease is primarily associated with HLA-DQ alleles. *Hum Immunol* 29(3), 157-65.
- Srinivasan, U., Leonard, N., Jones, E., Kasarda, D.D., Weir, D.G., O'Farrelly, C. & Feighery, C. (1996) Absence of oats toxicity in adult coeliac disease. *Bmj* 313(7068), 1300-1.
- Stepniak, D., Spaenij-Dekking, L., Mitea, C., Moester, M., de Ru, A., Baak-Pablo, R., van Veelen, P., Edens, L. & Koning, F. (2006) Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291(4), G621-9.
- Storsrud, S., Olsson, M., Arvidsson Lenner, R., Nilsson, L.A., Nilsson, O. & Kilander, A. (2003) Adult coeliac patients do tolerate large amounts of oats. *Eur J Clin Nutr* 57(1), 163-9.
- Stram, Y., Vilks, A. & Klinger, I. (2000) Detection of residues of genetically modified soybeans in breaded fried turkey cutlets. *Journal of Food Science* 65(4), 604-606.
- Straub, J.A., Hertel, C. & Hammes, W.P. (1999a) The fate of recombinant DNA in thermally treated fermented sausages. *Eur Food Res Technol* 210, 62-7.
- Straub, J.A., Hertel, C. & Hammes, W.P. (1999b) Limits of a PCR-based detection method for genetically modified soya beans in wheat bread production. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 208(2), 77-82.
- Studer, E., Dahinden, I., Luthy, J. & Hubner, P. (1997) Detection of the genetically engineered Maximizer Maize using the polymerase chain reaction (PCR). *Mitt Gebiete Lebensm Hyg* 88, 515-24.
- Studer, E., Rhyner, C., Luthy, J. & Hubner, P. (1998) Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 207(3), 207-213.
- Sulkanen, S., Halttunen, T., Laurila, K., Kolho, K.L., Korponay-Szabo, I.R., Sarnesto, A., Savilahti, E., Collin, P. & Maki, M. (1998) Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 115(6), 1322-8.

- Tapp, I., Malmberg, L., Rennel, E., Wik, M. & Syvanen, A.C. (2000) Homogeneous scoring of single-nucleotide polymorphisms: comparison of the 5'-nuclease TaqMan assay and Molecular Beacon probes. *Biotechniques* 28(4), 732-8.
- Tatham, A.S., Fido, R.J., Moore, C.M., Kasarda, D.D., Kuzmicky, D.D., Keen, J.N. & Shewry, P.R. (1996) Characterisation of the major prolamins of tef (*Eragrostis tef*) and finger millet (*Eleusine coracana*). *J Cereal Sci* 24, 65-71.
- Terzi, V., Infascelli, F., Tudisco, R., Russo, G., Stanca, A.M. & Faccioli, P. (2004) Quantitative detection of *Secale cereale* by real-time PCR amplification. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* 37(2), 239-246.
- Terzi, V., Malnati, M., Barbanera, M., Stanca, A.M. & Faccioli, P. (2003) Development of analytical systems based on real-time PCR for *Triticum* species-specific detection and quantitation of bread wheat contamination in semolina and pasta. *Journal of Cereal Science* 38(1), 87-94.
- Thompson, T. (2004) Gluten contamination of commercial oat products in the United States. *N Engl J Med* 351(19), 2021-2.
- Tilley, M. (2004) PCR amplification of wheat sequences from DNA extracted during milling and baking. *Cereal Chemistry* 81(1), 44-47.
- Troncone, R. & Ferguson, A. (1991) Anti-gliadin antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 12(2), 150-8.
- Troncone, R., Maurano, F., Rossi, M., Micillo, M., Greco, L., Auricchio, R., Salerno, G., Salvatore, F. & Sacchetti, L. (1999) IgA antibodies to tissue transglutaminase: An effective diagnostic test for celiac disease. *J Pediatr* 134(2), 166-71.
- Tursi, A., Brandimarte, G. & Giorgetti, G.M. (2003) Prevalence of antitissue transglutaminase antibodies in different degrees of intestinal damage in celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 36(3), 219-21.
- Tyagi, S. & Kramer, F.R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14(3), 303-8.

- Uhlig, H., Osman, A.A., Tanev, I.D., Viehweg, J. & Mothes, T. (1998) Role of tissue transglutaminase in gliadin binding to reticular extracellular matrix and relation to coeliac disease autoantibodies. *Autoimmunity* 28(4), 185-95.
- Urbonas, V. (1999) No harmful effect of oats in the diet of coeliac children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28, 572.
- Vader, L.W., de Ru, A., van der Wal, Y., Kooy, Y.M., Benckhuijsen, W., Mearin, M.L., Drijfhout, J.W., van Veelen, P. & Koning, F. (2002a) Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med* 195(5), 643-9.
- Vader, W., Kooy, Y., Van Veelen, P., De Ru, A., Harris, D., Benckhuijsen, W., Pena, S., Mearin, L., Drijfhout, J.W. & Koning, F. (2002b) The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* 122(7), 1729-37.
- Vaitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F. & Brignon, P. (1999) Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *J Agric Food Chem* 47(12), 5261-6.
- Valdes, I., Garcia, E., Llorente, M. & Mendez, E. (2003) Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15(5), 465-74.
- van de Wal, Y., Kooy, Y., van Veelen, P., Pena, S., Mearin, L., Papadopoulos, G. & Koning, F. (1998a) Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol* 161(4), 1585-8.
- Van De Wal, Y., Kooy, Y., Van Veelen, P., Vader, W., Koning, F. & Pena, S. (2000) Coeliac disease: it takes three to tango! *Gut* 46(5), 734-7.
- van de Wal, Y., Kooy, Y.M., van Veelen, P., Vader, W., August, S.A., Drijfhout, J.W., Pena, S.A. & Koning, F. (1999) Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *Eur J Immunol* 29(10), 3133-9.
- van de Wal, Y., Kooy, Y.M., van Veelen, P.A., Pena, S.A., Mearin, L.M., Molberg, O., Lundin, K.E., Sollid, L.M., Mutis, T., Benckhuijsen, W.E., Drijfhout, J.W. & Koning, F. (1998b)

- Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin fragment of gliadin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17), 10050-4.
- van Duijn, G., van Biert, R., Bleeker-Marcelis, H., Peppelman, H. & Helsing, M. (1999) Detection methods for genetically modified crops. *Food Control* 10(6), 375-378.
- van Eckert, R., Berghofer, E., Ciclitira, P.J., Chirido, F., Denery-Papini, S., Ellis, H.J., Ferranti, P., Goodwin, P., Immer, U., Mamone, G., Mendez, E., Mothes, T., Novalin, S., Osman, A., Rumbo, M., Stern, M., Thorell, L., Whim, A. & Wieser, H. (2006) Towards a new gliadin reference material-isolation and characterisation. *Journal of Cereal Science* 43(3), 331-341.
- Ventura, A., Bouquet, F., Sartorelli, C., Barbi, E., Torre, G. & Tommasini, G. (1991) Coeliac disease, folic acid deficiency and epilepsy with cerebral calcifications. *Acta Paediatr Scand* 80(5), 559-62.
- Vitoria, J.C., Arrieta, A., Astigarraga, I., Garcia-Masdevall, D. & Rodriguez-Soriano, J. (1994) Use of serological markers as a screening test in family members of patients with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 19(3), 304-9.
- Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J. & Kroath, H. (1999) Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* 47(12), 5038-43.
- von Buren, M., Stadler, M. & Luthy, J. (2001) Detection of wheat adulteration of spelt flour and products by PCR. *European Food Research and Technology* 212(2), 234-239.
- Walker-Smith, J.A., Guandalini, S., Schimitz, J., Shmerling, D.H. & Visakorpi, J.K. (1990) Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 65, 909-11.
- Watanabe, H., Abe, K., Emori, Y., Hosoyama, H. & Arai, S. (1991) Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains). *J Biol Chem* 266(25), 16897-902.
- Watts, T., Berti, I., Sapone, A., Gerarduzzi, T., Not, T., Zielke, R. & Fasano, A. (2005) Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8), 2916-21.

- Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T. & Little, S. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* 17(8), 804-7.
- Wieser, H. (1998) Investigations on the extractability of gluten proteins from wheat bread in comparison with flour. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 207(2), 128-132.
- Wieser, H. (2007) Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* 24(2), 115-9.
- Wilson, I.G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63(10), 3741-51.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. & Rasmussen, R.P. (1997a) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(1), 130-1, 134-8.
- Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Gundry, R.A. & Balis, U.J. (1997b) The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22(1), 176-81.
- Yamashita, T., Tazawa, S., Yawei, Z., Katayama, H., Kato, Y., Nishiwaki, K., Yokohama, Y. & Ishikawa, M. (2006) Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 28(4), 931-8.
- Zimmermann, A., Hemmer, W., Liniger, M., Lüthy, J. & Pauli, U. (1998a) A sensitive detection method for genetically modified MaixGard Corn using a nested PCR-system. *Lebensm Wiss U Technol* 31, 664-7.
- Zimmermann, A., Luthy, J. & Pauli, U. (1998b) Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 207(2), 81-90.
- Zimmermann, A., Luthy, J. & Pauli, U. (2000) Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* 33(3), 210-216.

Zimmermann, K. & Mannhalter, J.W. (1996) Technical aspects of quantitative competitive PCR. *Biotechniques* 21(2), 268-72, 274-9.

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. & Vitzthum, F. (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32(12), e103.