



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“IDENTIFICACIÓN Y AUTENTIFICACIÓN DE
ESPECIES DE IMPORTANCIA ALIMENTARIA, POR
MEDIO DE LA AMPLIFICACIÓN DE REGIONES
ESPECÍFICAS DEL DNA MITOCONDRIAL,
UTILIZANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

NORMA ANGÉLICA MARTÍNEZ BECERRA

ASESORES: DR. FRANCISCO MONTIEL SOSA
DRA. PATRICIA MIRANDA CASTRO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ESTADO NACIONAL
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Identificación y autenticación de especies de importancia
alimentaria, por medio de la amplificación de regiones específicas
del DNA mitocondrial, utilizando la Reacción en Cadena de la
Polimerasa (PCR).
que presenta la pasante: Norma Angélica Martínez Becerra
con número de cuenta: 09611113-2 para obtener el título de
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 07 de Septiembre de 2004

PRESIDENTE Dr. José Francisco Montiel Sosa

VOCAL MC. Clara Ines Alvarez Manrique

SECRETARIO IA. María Guadalupe López Franco

PRIMER SUPLENTE MC. María Guadalupe López Palacios

SEGUNDO SUPLENTE IA. Victor Manuel Avalos Avila

AGRADECIMIENTOS

... **a mis padres**, Emma y Alfonso, por su enorme paciencia, por su incondicional apoyo tanto moral como económico y por haber confiado en mí durante todo el camino. Gracias por enseñarme a ser fuerte y siempre luchar por mis ideales, a no dejarme vencer sino levantarme y seguir adelante pues como me dicen la constancia es la base del éxito. Sin su amor y su estímulo nunca hubiese llegado hasta aquí.

LOS QUIERO MUCHO

... **a mis hermanos**, Claudia y Mauricio, quienes han caminado siempre junto a mí y con quienes he compartido muchas alegrías, siendo siempre mis testigos y compañeros en cada paso de mi vida. A Mauri por su comprensión y por alegrarme siempre que estaba triste o tenso. A Claudia por ser mi amiga, escucharme, aconsejarme y entenderme cuando más lo necesite.

... **a toda mi familia**, por su alegría y su entusiasmo, por enseñarme que las cosas sólo se consiguen a base de esfuerzo y dedicación. Gracias a todos los quiero mucho.

... **a Román**, por brindarme su amor, confianza y apoyo; por sonreírme y protegerme. Gracias por escuchar mis problemas y ayudarme a encontrar una solución pero sobre todo porque en esos momentos difíciles me alentaste a seguir adelante y siempre estuviste ahí.

... **a mis asesores el Dr. Montiel y la Dra. Paty**, por su paciencia y consejos. Por indicarme mis errores y por ser una guía en la realización de este trabajo.

... **a la UNAM**, porque además de transmitirme sus valiosos conocimientos y el entusiasmo por aprender, me mostró el valor de trabajar con calidad y la importancia de mantener una actitud siempre crítica y a la vez abierta.

"Por mi raza hablará el espíritu"

Índice de figuras	i
Índice de cuadros	ii
Abreviaturas	iii
Resumen	iv
1. Antecedentes	1
2. Objetivos	15
3. Justificación	16
4. Importancia del etiquetado	17
4.1 Falsos etiquetados	20
5. Métodos utilizados para la identificación de especies	22
5.1 Técnicas de Proteínas	22
5.2 Técnicas de Biología molecular	26
6. DNA mitocondrial	30
6.1 Características	30
6.2 Diferencias entre el DNA mitocondrial (mtDNA) y el DNA Nuclear (nDNA)	32
6.3 Estructura	33
6.4 Disponibilidad y evaluación de secuencias de mtDNA, utilizando programas bioinformáticos	42
7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	46
7.1. Fundamento	46
7.2. Etapas de PCR	47
7.2.1 Desnaturalización	47
7.2.2 Hibridación	49
7.2.3 Elongación	49
7.3. Condiciones de la reacción	52
7.4. Requerimientos de la reacción	53
7.5. Detección y análisis de los productos de la reacción	55
7.6. Ventajas de PCR	56
7.7. Desventajas de PCR	57
7.8. Aplicaciones	57
8. Diseño del <i>primer</i> o cebador	60
8.1. Utilidad del <i>primer</i> o <i>cebador</i>	60
8.2. Características del cebador	61
8.3. Cálculo de la temperatura de hibridación (<i>annealing</i>)	62
9. Técnica de análisis de los productos de PCR	64
9.1 Electroforesis	64
9.1.1 Factores que intervienen en el desarrollo electroforético	65
9.1.2 Características generales de la corriente aplicada	66
9.1.3 Revelado	66
10. Técnicas de purificación de los productos de PCR	68
10.1 Precipitación con PEG/NaCl	69
10.2 Purificación con exonucleasa I/SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	70

10.3	Purificación por columna	70
10.4	Purificación en gel	71
11.	Técnicas complementarias que apoyan la autenticación de especies.	73
11.1	Secuenciación	73
11.1.1	Método manual de Sanger	74
11.1.2	Método automático de Maxam y Gilbert	78
11.2	Análisis de Polimorfismos en la longitud de los Fragmentos de restricción (RFLP)	82
11.3	Análisis de Polimorfismo del DNA amplificado con Cebadores arbitrarios (RAPD)	86
11.4	Análisis del Polimorfismo en la conformación de las Cadenas Sencillas (SSCP)	92
12.	Metodología experimental	95
13.	Alimentos que pueden ser sujeto de adulteración	96
13.1	Características de algunos productos pesqueros y la importancia de autenticarlos.	101
13.1.1	Lenguado	101
13.1.2	Bacalao	103
13.1.3	Rape	104
13.1.4	Róbalo y pez dorado	104
13.1.5	Salmón	105
13.1.6	Atún y Bonito	106
13.1.7	Merluza	107
13.1.8	Caviar	108
13.1.9	Especies cárnicas	109
13.1.10	Alimentos modificados genéticamente	110
14.	Condiciones de amplificación de algunas especies alimentarias analizadas por PCR.	111
14.1	Especies de atún	112
14.2	Especies de trucha	113
14.3	Salmón del Atlántico	114
14.4	Filete de pescado	115
14.5	Especies de pez planos	115
14.6	Diferentes especies pesqueras	116
14.7	Diferentes especies de caviar	117
14.8	Caracoles (Scargots)	118
14.9	Diferentes especies de carne.	119
14.10	Champiñones	121
15.	Conclusiones	122
16.	Anexos	124
17.	Glosario	126
18.	Referencias	129

Figura 1.	Conformación de una célula somática.	31
Figura 2.	Mapa del genoma mitocondrial humano.	34
Figura 3.	Forma de numeración del DNA mitocondrial (mtDNA).	35
Figura 4.	Proceso de transcripción.	37
Figura 5.	Inicio de la transcripción del RNA.	38
Figura 6.	Formación del transcrito primario.	39
Figura 7.	Formación de RNAs maduros.	39
Figura 8.	Amplificación <i>in vitro</i> de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	48
Figura 9.	Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	50
Figura 10.	Preparación del gel de agarosa.	65
Figura 11.	Esquema de una radiografía por electroforesis	67
Figura 12.	a)Unión del <i>primer</i> a la cadena molde b)Molécula ddNTP que detiene la elongación.	76
Figura 13.	Secuenciación manual por el método de Sanger.	77
Figura 14.	Componentes de la reacción de secuenciación automática.	79
Figura 15.	Secuenciación automática por el método de Maxam y Gilbert	80
Figura 16.	Análisis de Polimorfismos en Fragmentos de Restricción (RFLP).	84
Figura 17.	Análisis del Polimorfismo del DNA Amplificado con Cebadores Arbitrarios (RAPD).	88
Figura 18.	Lenguado.	102
Figura 19.	Bacalao.	103
Figura 20.	Rape.	104
Figura 21.	Róbalo.	105
Figura 22.	Salmón.	106
Figura 23.	Atún y Bonito.	107
Figura 24.	Merluza.	108

Cuadro 1.	Comparación entre los métodos basados en proteínas y los basados en ácidos nucleicos, para la identificación de especies.	28
Cuadro 2.	Técnicas de purificación.	68
Cuadro 3.	Metodología de experimentación.	95
Cuadro 4.	Alimentos analizados por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	99
Cuadro 5.	Análisis de PCR en especies de atún.	112
Cuadro 6.	Análisis de PCR-RFLP en Trucha arcoiris.	113
Cuadro 7.	Análisis de PCR-RFLP en especies de Trucha.	114
Cuadro 8.	Análisis de PCR-RFLP en Salmón del Atlántico.	114
Cuadro 9.	Análisis de PCR-RFLP en filete de pescado.	115
Cuadro 10.	Análisis de PCR-RFLP en especies de pez plano.	115
Cuadro 11.	Análisis de PCR-RAPD en diferentes especies de pescado.	116
Cuadro 12.	Análisis de PCR-RFLP en especies de caviar.	117
Cuadro 13.	Análisis de PCR en scargots.	118
Cuadro 14.	Análisis de PCR en carne de bovino.	119
Cuadro 15.	Análisis de PCR en carne de ovino, porcino, bovino y pollo.	119
Cuadro 16.	Análisis de PCR en cabra, ganado vacuno, oveja, cerdo, pollo.	120
Cuadro 17.	Análisis de PCR-RAPD en cerdo, res, cordero, pollo y pavo.	120
Cuadro 18.	Análisis de PCR-RFLP en champiñones.	121

ATP	Adenosin trifosfato
DNAbc	Ácido desoxirribonucleico bicaternario
DNAm	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
DNAmc	Ácido desoxirribonucleico monocaternario
DNA_n	Ácido desoxirribonucleico nuclear
dNTPs	Deoxirribonucleósidos trifosfatos
ddNTPs	Dideoxinucleósidos trifosfatos
FAO	Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
NADH	Enzima deshidrogenasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORFS	Marcos de lectura
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RAPD	Análisis de Polimorfismos del DNA amplificado con Cebadores Arbitrarios
RFLP	Análisis de Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción
RNA	Ácido Ribonucleico
SSCP	Análisis de Polimorfismos en la Conformación de las Cadenas Sencillas
T_a	Temperatura de annealing o hibridación
UV	Luz ultravioleta

RESUMEN

El presente trabajo tiene por objetivo determinar, a través de un estudio bibliográfico la importancia y las ventajas que presenta el emplear técnicas de Biología Molecular que utilizan al DNA, en especial de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación y autenticación de especies de importancia alimentaria. Esta estrategia permite reconocer posibles adulteraciones en diferentes productos lo cual es una problemática en México y en muchos otros países.

Para esto se recopiló información bibliográfica en relación a estas estrategias haciendo énfasis en especies de pescado. En este trabajo se muestran las ventajas que tiene el utilizar al DNA y a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), sobre la utilización de técnicas que emplean a proteínas como son: la electroforesis, cromatografía, pruebas inmunológicas, etc. A este respecto una de estas ventajas es la mayor estabilidad térmica y a la disponibilidad que tiene el DNA. De la misma forma se muestra que la mayor parte de estos trabajos de autenticación han preferido utilizar al DNA mitocondrial entre otras razones: por el conocimiento en detalle de su organización, la disponibilidad de secuencias de nucleótidos de las principales especies de importancia alimentaria, la mayor tasa de mutación con respecto al DNA nuclear, etc. Asimismo se presentan técnicas complementarias a la PCR que permiten profundizar en estos estudios. Entre estas técnicas se encuentran los Análisis de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), los Análisis de Polimorfismos de DNA Amplificado con Cebadores Aleatorios (RAPD), Análisis de Polimorfismos en la Conformación de las Cadenas Sencillas (SSCP) y finalmente la Secuenciación de DNA que es una de las estrategias más utilizada actualmente.

Alternativamente, se sugieren algunas especies pesqueras que pueden ser sujeto de adulteración, debido a la gran demanda que se tiene del producto, lo que podría favorecer posibles adulteraciones con especies de menor costo.

Finalmente se presentan algunos estudios de identificación y autenticación realizadas en diferentes especies. Esta información se ordena y se presenta mostrando aspectos esenciales del diseño experimental como son: secuencias de los *primers* específicos y región del DNA mitocondrial amplificada, programa de amplificación, lo que permitirá a los interesados en estos trabajos una fácil y accesible información.

1. ANTECEDENTES

Varios métodos han sido diseñados para la identificación de especies (animales, vegetales) en alimentos crudos o productos procesados para proteger a los consumidores de fraudes y adulteraciones. Hoy en día existen muchos métodos para la determinación de estas especies, las cuales se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellos basados en el análisis de proteínas y los basados en el DNA. Dentro de los métodos de análisis de proteínas se encuentran las técnicas electroforéticas, de cromatografía y técnicas inmunológicas^{60, 76, 80}. Por otro lado, uno de los métodos basados en el DNA es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)^{14, 45, 82}. Estos métodos pueden ser usados para la identificación de especies cárnicas, pescado, alimentos modificados genéticamente o cualquier tipo de alimento. Las técnicas basadas en el análisis de proteínas han sido muy utilizadas pero pueden ser inexactas debido a que las proteínas se desnaturalizan por el proceso térmico⁵⁴. Mientras que las técnicas basadas en el DNA tienen la ventaja de que el ácido nucleico es, hasta cierto punto, estable al calor, permitiendo fácilmente el análisis de productos procesados, además de que el tamaño de muestra necesaria que se requiere para emplear esta técnica es muy pequeña y puede ser extraída de cualquier lugar, como por ejemplo, sangre, tejido, etc., puesto que no importa su origen y por lo tanto son técnicas muy usadas hoy en día^{2, 41, 94, 115, 117}.

Antes de la década de los 70, pocos apostaban por la biotecnología del DNA. Sin embargo, entre 1971 y 1972 Lobban, Jackson y otros colaboradores describieron métodos basados en el DNA. Poco después en 1973 Boyer, Cohen y otros colaboradores, llevaron a cabo los primeros experimentos de clonación molecular. Estos experimentos consistieron en la inserción de fragmentos de DNA en plásmidos (vectores o vehículos), generando así moléculas de DNA recombinante. Dichas construcciones (huéspedes) eran transferidas a bacterias hospedadoras, donde se podían replicar. A partir de estas descripciones, los logros en este

campo fueron tan grandes que se estableció un nuevo paradigma en las ciencias de la vida ¹⁰⁰.

En los últimos años se han desarrollado nuevas y diversas metodologías para identificar a organismos celulares (animales, plantas y microorganismos), así como a entidades acelulares (virus, viroides y priones). Estas tecnologías se basan en la identificación de las diferencias existentes en determinadas biomoléculas (proteínas o ácidos nucleicos) y son conocidas genéricamente bajo la denominación de "*Huella Digital*", "*Huella Genética*", "*Tipaje*", "*Genotipaje*", "*Mapa Genético o Peptídico*" (*Fingerprinting*), y recientemente también han recibido el nombre de "*Marcadores Moleculares*" (*Molecular Markers*)¹⁰⁷. Los "*marcadores moleculares*" tienen diversas e importantes aplicaciones, como por ejemplo para el control de calidad y la verificación de la denominación de origen, o cuando se desee detectar un posible fraude en algún producto alimenticio. Asimismo, cuando se pretenda asociar características de interés a marcadores moleculares para su uso en mejora genética. En definitiva, estas técnicas se podrán emplear siempre que se trate de identificar material biológico o restos del mismo, bien por su interés directo o por sus implicaciones ¹¹⁰.

Aunque el progreso en las diferentes ciencias parece ser lento y su evolución resulta ser de "paso a paso", en el caso de la Biología Molecular ha sucedido lo contrario. Dicha disciplina ha sido afortunada con grandes cambios en un tiempo relativamente corto. Uno de estos, produjo un gran número de descubrimientos, entre ellos: la identificación de enzimas de restricción, el desarrollo de vectores de clonación y la introducción de técnicas nuevas. Un segundo salto tecnológico ocurrió en 1985, con la introducción de la herramienta con mayor aplicación en el laboratorio: la Reacción en Cadena de la Polimerasa, mejor conocida por sus siglas en inglés PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que fue inventada y desarrollada por el químico Kary B. Mullis quien ganó por sus trabajos el premio Nóbel de química en 1993 ¹⁰⁷.

La técnica de PCR se basa en amplificar enzimáticamente una secuencia específica de DNA de las especies en estudio usando patrones específicos o cebadores (*primers*). Las aplicaciones diagnósticas de esta técnica se realizan en campos tan diversos como el de las enfermedades infecciosas (*SIDA, Virus del Papiloma Humano, Hepatitis C, Tuberculosis, Clamidia, Herpes, Malaria, etc.*), en el estudio de enfermedades genéticas (*enfermedad de Duchenne, fibrosis quística, etc.*), oncología (*oncogenes*), en medicina legal identificando paternidad o culpabilidad en líquidos biológicos, y actualmente se utiliza ampliamente en el área de alimentos para la autenticación e identificación de especies que han sido adicionadas a los productos con fines de lucro o de ahorro en los costos de producción. Como se puede apreciar, las aplicaciones de esta novedosa técnica parecen no tener límites pues en esencia, el proceso permite a los científicos encontrar una aguja en un pajar creando un pajar lleno de agujas ^{2, 110}.

Los grandes avances en las técnicas de Biología Molecular acontecidos en las dos últimas décadas, han permitido el análisis directo de la secuencia de nucleótidos del ácido desoxirribonucleico (DNA) de diferentes organismos. El estudio directo del DNA ha dado lugar al desarrollo de un buen número de técnicas genéticas para la identificación de especies, tanto de pescado, como plantas y animales ⁵³.

El análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) del DNA mitocondrial (mtDNA) fue la primera técnica genética que se empleó en la identificación de especies, sin embargo, ha sido la amplificación de fragmentos específicos de DNA gracias a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la base para la expansión de nuevas técnicas genéticas, más rápidas y eficaces, que son las que verdaderamente han permitido la identificación de un gran número de especies. Dentro de ellas se encuentran: secuenciación de fragmentos de DNA amplificados por PCR (PCR- secuenciación), análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción de DNA amplificados por PCR (PCR-RFLP), análisis

amplificado con cebadotes arbitrarios (PCR-RAPD) y el análisis del polimorfismo en la conformación de cadenas sencillas de DNA amplificadas por PCR (PCR-SSCP) ¹³.

Anteriormente la autenticación de alimentos involucraba la detección de especies por medio de proteínas específicas, pero se tenían algunos problemas, ya que como en la mayoría se detectaba proteínas en plasma, era un problema pues la carne puede ser adulterada con sangre de otras especies y por lo tanto dar resultados falsos. Es por tal motivo que este trabajo se centra en el estudio del análisis de Ácidos Nucleicos en especial el DNA mitocondrial (mtDNA) ya que ha sido muy usado para estudios filogenéticos relacionados entre especies, debido a que es una biomolécula presente en todas y cada una de las células constituyentes de los organismos, la cual revela la información de los genes y es diferente para cada una de las especies existentes, además de su alto índice de mutación, lo que facilita encontrar diferencias en la secuencia de especies muy similares. Así mismo, la diferenciación de secuencias de DNA mitocondrial resulta más fácil a nivel de especie y subespecie ^{17, 83, 90, 93}.

Estas técnicas son muy importantes debido a que la producción de alimentos y su comercialización constituyen una empresa sumamente competitiva, aunque siempre existe el incentivo de aumentar las utilidades con sustitutos de menor calidad o de agregar grandes cantidades de ingredientes más baratos tales como agua, cereales, grasas o especies de menor costo, esto crea la necesidad de un programa de control continuo, usando métodos no morfológicos de identificación para evitar la sustitución de especies y contribuir a la calidad de estos productos desde un punto de vista higiénico sanitaria ^{79, 92}.

En el caso de productos cárnicos es muy común que se de una adulteración de especies debido a los grandes beneficios que se logran con ello, dando como resultado productos menos costosos y de baja calidad ya que pueden ser

adicionadas carnes de menor valor sustituyendo a carnes mucho más demandadas y especies de altos precios. Es por ello que en caso de que sea necesario establecer la identidad de forma inequívoca para comprobar, por ejemplo lo que se declara en la etiqueta del producto o lo que se especifica en un contrato comercial, resulta imprescindible disponer de un medio fiable de identificación que no sea simplemente un criterio sensorial ^{31, 93}.

Para prevenir a los consumidores de posibles fraudes es necesario el estudio cualitativo así como cuantitativo ya que tradicionalmente, la diferenciación de especies animales se ha realizado atendiendo a diferentes características morfológicas y organolépticas que diferencian a los individuos de cada especie aunque esto no siempre es posible, como en el caso del pescado que se somete después de su captura a operaciones de evisceración, fileteado, picado, etc., antes de su venta al consumidor o a las industrias de transformación. Estas operaciones provocan las pérdidas de las características morfológicas externas que hacen difícil su identificación, y por tanto dificulta su correcta valoración comercial ^{5, 115}.

Además de la posible pérdida económica, la identificación correcta de especies es importante para el consumidor por razones como: requerimientos médicos de individuos que pueden tener alergias específicas a los alimentos o restricciones dietéticas por religión ^{36, 54}.

La identificación de las especies que componen los alimentos es un asunto de vital importancia para el control de la calidad en la industria agroalimentaria ya que la sustitución de unas especies por otras de menor valor económico, durante la fabricación de cualquier tipo de producto, supone un fraude para el consumidor así como para las empresas distribuidoras y por lo tanto se requieren de técnicas precisas que identifiquen este tipo de falsificación ¹¹⁵. Igualmente, el consumidor quiere comprar un producto con características específicas que le satisfagan.

Necesita un sistema en el cual confiar para identificar el producto con las características específicas que quiere comprar. Durante algún tiempo la legislación alimentaria siguió una línea restrictiva en cuanto a la utilización de rellenos en la industria alimentaria, debido a la tendencia de algunos productores a introducir especies de manera fraudulenta, como adulterantes no declarados en la etiqueta. La correcta declaración de los ingredientes, es importante no sólo desde el punto de vista de identidad legal del producto, sino para la protección de la salud de los consumidores, una parte de los cuales padece alergias a diversos alimentos, incluidos algunos que se emplean como ingredientes de los productos cárnicos ¹⁰⁶.

El principal problema para el desarrollo y aplicación de las técnicas de identificación de variedades alimenticias, es el gran número de especies diferentes que se comercializan en todo el mundo, así como la gran cantidad de productos en que éstas se transforman. Esto dificulta en gran medida la identificación por medio de una sola técnica que sea válida en todos los casos ¹³.

Es por ello que el diseño de métodos de análisis eficaces, rápidos y de bajo costo que permitan la identificación de especies cuando se carecen de base anatómica, tienen gran importancia para garantizar el correcto etiquetado de los productos expuestos a la venta y así ofrecer a las empresas de transformación y a los consumidores, una mayor protección ^{14, 82}.

Por otro lado, debido a que las empresas del sector alimentario requieren herramientas analíticas avanzadas que permitan verificar con la máxima fiabilidad, especificidad y pureza de los productos que comercializan, las técnicas de Biología Molecular, en especial la técnica de PCR, facilitan valoraciones rutinarias de control ya que la detección de especies alimenticias merece especial atención debido a la reciente crisis en el sector alimentario, pues los consumidores demandan gran protección de etiquetados falsos en los productos alimentarios por razones económicas, religiosas y de salud. De esta manera, la prevención de

prácticas fraudulentas, hoy día, constituye una parte importante del control regulatorio de alimentos ^{7, 36, 76}.

El pescado es un alimento muy importante en la dieta humana y por tanto existen enormes industrias para proveer una enorme variedad de productos de consumo en los cuales el pescado es el mayor componente. Estas ofertas alcanzan desde pescados grandes y pequeños, como filetes, pescado enlatado en múltiples formas, productos secados y curados, aceite y extracto de pescado, pescado congelado, harina de pescado, etc. La lista es enorme, y la variedad de especies empleadas dentro de un solo producto son amplias y variadas. Cada variación y combinación presenta una enorme mezcla de posibilidades, oportunidades y problemas y por lo tanto se requieren de técnicas específicas de análisis para la identificación de especies filogenéticamente similares ⁴⁹.

Desde hace más de 80 años, los tecnólogos y científicos se han esforzado para proponer algunas normas generales de observación y experimentación para el control de pescado y productos pesqueros y predecir sus propiedades bajo una gran variedad de circunstancias. Hace algunas décadas, la mayoría de las ciudades europeas consumían productos marítimos provenientes casi exclusivamente de sus propias flotas de peces de las aguas cercanas. Este factor restringía el consumo de pescados en un número limitado de especies, todas estas eran muy conocidas por el factor involucrado en la captura y distribución de los productos marítimos, desde el pescador hasta el consumidor. La mayoría de los embarques consistían en un número importante de todos los especímenes, aún no eviscerados, de una o varias especies que eran fáciles de reconocer debido a la presencia de todas sus características morfológicas. La globalización debido al incremento y desarrollo de las comunicaciones mundiales aéreas, marítimas y terrestres, conduce a un aumento en el número de especies de pescado, en fresco o procesado, estando presente en el mercado ⁴⁹.

Por ejemplo, la merluza Europea (*Merluccius merliccius*) es una especie del sur de Europa altamente apreciada y costosa, que pertenece a la familia de las Gadiformes. Hace pocos años, casi todas las merluzas consumidas en Europa provenían de aguas cercanas y la mayoría correspondía a las especies de *Merliccius merluccius*. Hoy en día, los mercados europeos son abastecidos con merluza fresca y congelada provenientes de otras ciudades como Argentina y Chile (*M.hubsi* y *M.gayi*) o del sur de África (*M.capensis* y *M.productos*) y con otros productos etiquetados como merluza, tales como dedos o filetes de pescado, los cuales han sido producidos usando especies mucho más baratas (*Mucruronus spp*)⁶.

Este consumo se extendió a nuevas especies que han sido acompañadas con un continuo incremento en la pesca. Datos de la FAO (2000) indican que la captura global de pescado en 1998 fue de cerca de 9 millones de toneladas por año, y que la captura total tuvo un incremento del 5% de 1950 a 1990, aumentando también el número de especies de alto valor comercial. El consumo de pescado ha seguido el mismo camino, pues ha incrementado de 40 millones de toneladas en 1970 a 86 millones de toneladas, con un incremento del 31% en el consumo entre 1997 a 2003. Al mismo tiempo, ha disminuido la captura de especies más apreciadas, como el bacalao, lenguado o la merluza europea, debido principalmente a la sobreexplotación de recursos y por lo tanto están siendo reemplazados por especies alternativas¹⁰⁶.

Evidentemente, el precio de cada especie o producto derivado esta en función de variables como la calidad intrínseca, aceptación del consumidor o demanda (es variable de una ciudad a otra), recursos abundantes o escasos, etc. En muchos casos, los consumidores deberían ser informados acerca de los productos que van a comprar. Esto también concierne a la industria de pescado debido a que todos los días se procesa material (con precios variables dependiendo de la calidad y especies) y que la industria sea la responsable del etiquetado de los productos

marítimos, ya que el consumidor necesita conocer la especie utilizada en el proceso de elaboración ⁶.

Durante la última década, la Unión Europea ha estado emitiendo normativa para el etiquetado de alimentos, incluyendo el pescado y productos pesqueros, demandando la información que deberían incluir en la etiqueta. Para el control de estas regulaciones, la administración debería tener las herramientas adecuadas para verificar, entre otros requisitos, la autenticidad de las especies indicadas en la etiqueta. Y por otro lado en México no existe aún una regulación que verifique y normalice estas prácticas ¹⁰⁶.

La identificación de una especie de pescado en particular o el reconocimiento de sus características morfológicas como piel, forma, tamaño del cuerpo, forma y número de aletas, ojos y órganos internos aún cuando todas las características morfológicas sean intactas, y se utilice especies relacionadas, la identificación de las especies es más difícil y solamente un taxónomo puede realizarlo correctamente. Cuando estas características son removidas, por ejemplo, cuando el pescado es procesado (deshuesado, eviscerado, despellejado, fileteado, etc.) o drásticamente transformado (ahumado, cocinado o enlatado) la identificación de especies es muy difícil o casi imposible. Debido a ello es que se necesitan métodos alternativos para la identificación de especies ⁶.

Como ejemplos de especies que se reportan que han sido adulteradas se encuentra el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) es principalmente capturado y por lo tanto ha sido drásticamente agotado. El número de productos en el mercado etiquetados como bacalao, lejos de disminuir esta aumentando. Por ejemplo, especies de gadoid están siendo usadas para la preparación de productos etiquetados como bacalao. Los Pleuronectiformes o los pescados planos son de una clase con un alto número de especies. El lenguado (*Solea solea*), rodaballo (*Seophthalmus maximus*), o platija Europea (*Pleuronectes*

plateas) son especies muy apreciadas y conocidas en Europa y por lo tanto pueden ser encontradas en el mercado productos etiquetados con estas especies conteniendo otras más baratas que pertenecen a la misma familia. Las especies de atún son pescados con gran demanda en el mercado alrededor del mundo. El valor comercial de este grupo de especies es muy alto y en muchas partes del mundo estas especies son apreciadas y valoradas en forma distinta. Europa ha regulado el asunto concerniente al etiquetado de albacore (*Thunnus alalunga*) y el atún de aleta amarilla (*T. albacares*), además estas especies pueden ser sustituidas por especies de atún más barato como el bigeye (*T. obesus*) o skipjack (*Katsuwonus pelamis*). Finalmente, las especies protegidas, como los esturiones o ballenas, pueden ser encontradas en el mercado de alimentos de manera ilegal y la prueba de su utilización es difícil de mostrar si se carecen de características morfológicas ^{6, 70}.

Los productos de pescado como alimento derivan de materias primas muy distintas. A diferencia de los productos cárnicos que se obtienen de una sola especie, en la pesca existe una enorme variedad de especies que se capturan y comercializan como alimento. A modo ilustrativo, las estadísticas anuales de la FAO sobre capturas y desembarques agrupan especies similares, en lugar de enumerar a todas las especies, y aún así, hay 1080 categorías distintas ¹⁰⁶.

No solo hay muchas variedades disponibles de materia prima para el sector pesquero post-captura, sino que también existe una gran cantidad de mercados y diferentes tipos de productos comercializados. Por ejemplo, el pescado se vende fresco, refrigerado, congelado, tratado térmicamente, fermentado, secado, ahumado, salado, marinado, cocido, frito, congelado, desmenuzado, deshidratado y de forma en que se puedan combinar varios de estos procesos. Para cada uno de estos tipos de transformaciones, se puede preparar y embalar el pescado de muchas maneras distintas, dependiendo del lugar y de la demanda ¹⁰⁶.

Existen razones ecológicas, sociales y económicas por las cuales es muy importante asegurar que el pescado, una vez capturado, llegue al consumidor por medios eficientes, y que la venta final se realice a entera satisfacción del consumidor y del vendedor, quien representa en ese momento a los intereses de todos los demás involucrados en la industria pesquera.

Otra de las razones por las cuales es necesario obtener pescado para el consumidor con el mínimo de pérdidas y con la óptima eficiencia, tienen que ver con su carácter de valiosa fuente de nutrientes para muchas personas en el mundo. La razón esencial de las actividades pesqueras y de cría es la contribución al suministro de alimentos como fuente importante de proteínas. Frecuentemente, el pescado no es considerado importante en términos de seguridad alimentaria nacional, pues contribuye poco en términos de calorías aportadas a la dieta. En el ámbito individual y doméstico, el pescado puede ser muy importante desde el punto de vista nutricional, puesto que es una fuente de proteína de fácil digestión y de alta calidad, con un contenido de aminoácidos esenciales, particularmente de lisina, que no es fácilmente obtenible de otras fuentes en concentraciones tan altas. A su vez, los lípidos que contiene el pescado tienen un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados, particularmente de ácidos omega 3. Estos ácidos tienen efectos benéficos para la salud al prevenir enfermedades cardiovasculares, contribuir al funcionamiento cerebral y el desarrollo fetal e infantil ¹⁰⁶.

La responsabilidad práctica e inmediata de garantizar que el pescado sea no adulterado, reside en los productores de dicho pescado, que abarca desde el pescador al minorista, pasando por el procesador, los comerciantes, distribuidores y transportistas. El Estado, sin embargo, tiene el deber de cuidar a la población. Este cuidado estará mejor respaldado por una legislación que obligue a que los productores pesqueros cuenten con un programa funcional y efectivo de garantizar la calidad/inocuidad; que tenga un personal capacitado desarrollando ese programa, y que estén procesando el alimento en condiciones higiénicas ¹⁰⁶.

Los productos alimenticios en fresco o procesado, deberán ser protegidos de falsos etiquetados que pueden tener alimentos desconocidos, o especies menos deseables. Ya que personas susceptibles pueden sufrir de alergias causadas por ingredientes desconocidos ⁵⁴. Es por ello que existe la necesidad de identificarlos por medio de técnicas específicas y de gran resolución como lo es la técnica de PCR utilizando el DNA mitocondrial debido a su gran estabilidad a los procesos térmicos y sin importar su procedencia ^{5, 74}.

En la actualidad, han sido analizadas muchas secuencias de DNA genómico o mitocondrial (generalmente el citocromo b) de varios animales como pescado, especies de caza, varios animales domésticos además de plantas y organismos genéticamente modificados (OMG) ⁹³. Principalmente la aplicación de PCR en la identificación de pescado ha aumentado, debido a la gran variedad de especies que han sido secuenciadas y analizadas por varios autores y por lo tanto hay mayor información ¹⁵.

La técnica de PCR también se ha empleado para prevenir el fraude y el falso etiquetado de los productos pesqueros y así poder identificar y cuantificar las especies de pescado presentes en alimentos procesados, pues hasta ahora, no había sido posible cuantificar de manera fiable estos constituyentes en alimentos, debido al gran deterioro de sus componentes provocadas por las condiciones del proceso al que son sometidos, y a la extensa variedad de especies pesqueras que se comercializan actualmente.

El alto grado de variabilidad genética que se puede analizar con la técnica de RFLP (Análisis de Polimorfismos en la longitud de los Fragmentos de Restricción) ha determinado su aplicación directa al estudio de poblaciones utilizando fundamentalmente el mtDNA. De este modo, se ha estudiado la variabilidad genética en poblaciones de viera (*Pecten maximus*)⁷¹, cangrejo (*Austropotamobitus pallipes*), platija (*Platichthys flesus*, *Platichthys stellatus*) y distintos salmónidos

(*Salmo salar*, *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus kisutch*, *Salvelinus fontinalis*), entre otras especies de pescado.

Por medio de la técnica de PCR se han identificado especies de pescado como salmón (*Salmo salar*) y trucha (*Salmo trutta*) amplificando un gen, el que codifica la subunidad 5S del rRNA, cuyo tamaño es específico para cada especie. Utilizando este mismo gen se han identificado dos especies de peces planos como el lenguado (*Solea solea*) y el fletán negro (*Reinhardtius hippoglossoides*)¹³.

Utilizando la técnica de PCR- secuenciación se han identificado distintas especies de túnidos (*Thunnus alalunga*, *Sarda sarda*, *Thunnus obesus*, *Thunnus albacares*, *Katsuwonus pelamos* y *Thunnus thynnus*), bonito (*Enthynnus affinis*) y caballa (*Auxis thazard*)⁶⁷.

En el caso de estudios de población dentro de una especie, la técnica de PCR-RFLP se ha aplicado a zonas que presentan gran variabilidad genética, como la región control. De este modo, se ha estudiado la variabilidad genética de poblaciones de salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*), gallineta (*Sebastes flavidus*), mejillón (*Mytilus trossulus* y *Mytilus galloprovincialis*), atún blanco (*Thunnus alalunga*) trucha (*Salmo trutta*), distintas especies de carpa (*Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis*, etc) y pez espada (*Xiphias gladius*) entre otras especies de pescado. También se han identificado cuatro especies de peces planos, lenguado (*Solea solea*), solla (*Pleuronectes plateas*), platija (*Platichthys flesus*) y fletán negro (*Reinhardtius hippoglossoides*). Para ello seleccionaron dos fragmentos del gen del citocromo b, de 359 pb y 201 pb respectivamente. Con el empleo de la técnica de SSCP (Análisis de Polimorfismos en la Conformación de Cadenas Sencillas) se han identificado 4 especies de peces planos (*Solea solea*, *Pleuronectes plateas*, *Platichthys flesus* y *Reinhardtius hippoglossoides*). Para ello utilizaron un fragmento de 201 pb del gen del citocromo b. La técnica de RAPD (Análisis de Polimorfismos del DNA amplificado

con Cebadores Arbitrarios) se ha utilizado con éxito en numerosos trabajos de identificación de especies de pescado, como por ejemplo la identificación de tres especies de tilapia del género *Oreochromis* (*O. aureus*, *O. mossambicus* y *O. niloticus*) y cuatro subespecies de *O. niloticus* (*O. n. sadcani*, *O. n. barigoensis*, *O. n. niloticus* y *O. n. baobab*)^{13, 15, 16}.

Por estas razones, los análisis basados en los ácidos nucleicos son hoy en día una de las técnicas mejor empleadas para la identificación de especies en alimentos procesados y sin procesar, por lo que decidí su estudio. Por lo tanto se pretende establecer la importancia y las ventajas de realizar un análisis de PCR, pues es una técnica sensible y fiable para identificar y cuantificar alimentos. Asimismo, se darán algunos puntos clave que se necesitan tomar en cuenta antes de realizar un análisis de PCR tanto en productos crudos como procesados. Por otro lado se mostrarán protocolos y procedimientos para la identificación de productos alimenticios, en especial pesqueros que podrían ser sujeto de adulteración, debido a que éstos no siempre cuentan con buenas prácticas de manufactura o estándares de calidad que certifiquen la adecuada procedencia de la especie utilizada para su elaboración. Asimismo, se presentarán alternativas de cómo poder detectar alguna posible adulteración por medio de una técnica innovadora, rápida y sensible como lo es la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cuando los alimentos en crudo o procesado carecen de criterios morfológicos usuales tales como forma, tamaño o pigmentación de la piel

31, 93

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la importancia que tiene aplicar técnicas de Biología Molecular que utilizan DNA, para la identificación y autenticación de especies de importancia alimentaria.

OBJETIVO PARTICULAR 1

Realizar una revisión bibliográfica de algunos alimentos (en especial pescado) en crudo o procesado que han sido autenticados por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) amplificando regiones específicas de DNA mitocondrial.

OBJETIVO PARTICULAR 2

Presentar la información que incluya la metodología específica (especie, *primers*, región amplificada, etc.) para diferentes tipos de alimentos en fresco o procesados, enfatizando en especies y variedades de pescado, autenticado por estas técnicas.

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la primordial utilización de las técnicas moleculares en la identificación y autenticación de especies de importancia alimentaria en diferentes países, en México aún es reducida, lo cual abre una gama de posibilidades de estudio debido a la gran variedad de especies pesqueras que se comercializan actualmente, utilizando principalmente el DNA mitocondrial para la amplificación y autenticación.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se pretende presentar la metodología molecular que utiliza la amplificación de regiones específicas de DNA mitocondrial por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la autenticación de especies de importancia alimentaria haciendo énfasis en el análisis para diferentes especies de pescado.

4. IMPORTANCIA DEL ETIQUETADO

Pocos temas relacionados con los alimentos han despertado tanta controversia como su etiquetado. Si bien todos están de acuerdo en que los consumidores en todo el mundo deberían tener información exacta acerca del contenido nutritivo de sus alimentos, así como su naturaleza. El etiquetado es el tema central de las negociaciones internacionales en la *Comisión del Codex Alimentario (código alimentario)* y de la *Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación (FAO)*, la cual dice que los alimentos deben cumplir con diversos requisitos de calidad para ser considerados inocuos, fiables y nutritivos para la población ⁹⁹.

Por adulteración se debe entender el conjunto de actividades que tienen la finalidad de encubrir o disimular la naturaleza de un producto, su composición, características comerciales o sanitarias y defectos durante el proceso de elaboración. Durante el proceso de elaboración, es posible incorporar ingredientes "ajenos" con el propósito de adulterar a los productos alimenticios. Se ha observado que la adición intencional de especies extrañas se puede efectuar en dos momentos diferentes: uno previo a la entrega que hace el productor a la industria y otro durante el procesado en la industria. En ambos casos se cometen fraudes y se miente al consumidor, vendiéndole un producto que no cumple con las especificaciones previamente acordadas y estipuladas en la legislación vigente ¹¹².

Existe cierta superposición y una posible confusión en cuanto al uso del término sin adulteración, que puede aclararse de la siguiente manera.

- **Pescado no adulterado.** El pescado se adultera por un acto deliberado que apunta al engaño del consumidor en lo que atañe a su valor real, por medio de la sustitución con elementos constitutivos inferiores. Esto puede hacerse con pescado de inferior valor, o con otros materiales alimenticios que se parezcan al

pescado, pero quizás tengan el mismo valor nutricional. En este contexto, la adulteración está por lo tanto, asociada al fraude deliberado del productor hacia el consumidor ¹⁰⁶.

Para evitar estas prácticas fraudulentas, los gobiernos promulgan leyes, reglamentos y normas con el fin de proteger a los alimentos, impedir su adulteración y deterioro así como mantener su valor nutritivo y comercial. En el caso de México, la Ley General de Salud expresa este propósito a través del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios ¹¹².

La protección al consumidor frente al fraude es un aspecto subrayado en el Código, que exhorta a los Estados a establecer y mantener sistemas efectivos para detectar, impedir o prevenir el fraude comercial. Por su propia naturaleza, el fraude está diseñado para engañar generando lucros indebidos; por lo tanto, es difícil de detectar. Este fraude puede darse en distintas formas, por ejemplo:

- Identificación tergiversada o sustitución de las especies pesqueras
- Pesos y embalajes erróneos
- Embalaje deliberadamente insuficiente
- Uso excesivo de aditivos (por ejemplo: soya)
- Peso inexacto a nivel minorista
- Rotulación tergiversada en el país de origen

Si se quiere cometer fraude, se hará, y es responsabilidad del Estado poner en práctica los mecanismos que permitan arrestar al infractor, y que si lo arresta, se lo procese. La verificación de pesos y medidas en el acto de la fabricación y venta de productos, el análisis de los productos finales para comprobar su composición entre el público y las autoridades que permitan reportar las sospechas, son medios posibles para impedir el fraude.

El uso de sistemas para garantizar la calidad en los que participan todos los empleados de una planta productora, también puede contribuir a dificultar el fraude, ya que se debería involucrar a un gran número de personas en el engaño, en la cooperación y para encubrir el hecho.

Para que los Estados puedan garantizar la protección de los derechos de los consumidores, es necesario fijar normas mínimas de garantía de la calidad y la inocuidad. El Programa Conjunto de Normas Alimentarias de la FAO/OMS, que funciona sobre todo por medio de la Comisión del Codex Alimentarius, fue fijado para proteger al consumidor sobre los riesgos para su salud y el fraude, para asegurar buenas prácticas en el comercio de alimentos, y para facilitar la comercialización de los mismo a nivel internacional ¹⁰⁶.

Es indudable que el control de la calidad alimentaria corresponde al Estado en sus diferentes niveles. Por su diversidad y extensión, el mercado de alimentos resulta de gran complejidad y requiere un tratamiento sistemático por parte del Estado. Debe existir plena transparencia en los productos alimenticios que consumimos y así el consumidor debe elegir libremente y con conocimiento de causa lo que consume y ante todo debe hacerse valer el principio de precaución a la hora de aventurarse a dar luz verde a productos alimenticios desarrollados mediante una tecnología que no ofrece las suficientes garantías de confianza a los consumidores y a numerosos expertos científicos. El Estado tiene la obligación de velar por la salud pública mediante leyes y normativas adecuadas a estos principios. Por lo tanto las personas tienen el derecho a estar debidamente informadas y decidir qué es lo que quieren consumir. El etiquetado permitirá a los consumidores decidir de manera informada qué alimentos consumirán y de qué modo su poder de compra afectará el mercado, su salud y el medio ambiente ¹¹².

4.1 Falsos etiquetados

Los consumidores en todo el mundo tienen cada vez más acceso a nuevos productos alimenticios e información sobre los alimentos. Aunque esto es generalmente positivo, hay gran preocupación de que los consumidores puedan ser engañados por las etiquetas alimentarias. Este tema es muy importante para el Codex debido a los malos etiquetados, que afectan adversamente tanto la salud del consumidor como el comercio de alimentos. Comunicaciones veraces pero falsas pueden llevar a los consumidores a hacer inferencias incorrectas. Tanto la presencia como la ausencia de información son relevantes en lo que respecta a un mal etiquetado. Las comunicaciones fraudulentas con frecuencia involucran declaraciones, símbolos o imágenes que son literalmente ciertas pero que conducen a los consumidores a hacer inferencias falsas. La interpretación de afirmaciones falsas pudiera ser afectada por factores como la cultura, conocimiento y educación, así como por las características de la etiqueta. Una etiqueta que podría ser equivocada para un grupo o cultura podría no serlo para otra. Las etiquetas pueden ser irreales porque se ha omitido un hecho material, se usa lenguaje o símbolos confusos, y los consumidores hacen inferencias incorrectas a atributos que no se mencionan que son el tema de una afirmación, o se usa inapropiadamente una promoción. Se puede prevenir la representación engañosa en la etiqueta alimentaria, por ejemplo, requiriendo información adicional, estableciendo normas o prohibiendo representaciones que se consideren inherentemente falsas ⁹⁹.

La información a la que tenemos acceso a través de los rótulos, es fundamental en el momento de compra para conocer las características particulares de los alimentos, su forma de preparación, manipulación, conservación, sus propiedades nutricionales y su contenido.

En materia de comercio de alimentos, hay un acuerdo de voluntades en el que por una parte, el oferente, entrega un producto; y el consumidor paga por dicho bien. Como en todo contrato se derivan derechos y obligaciones y así el consumidor es titular de un derecho subjetivo que le permite exigir de la oferente información clara, relevante, veraz y suficiente sobre el producto objeto ¹¹².

De acuerdo a la norma 028-SSA1-1993 los productos alimenticios, deben llevar un rótulo en su envase, redactado en el idioma donde se consume, en el que consten:

- Denominación y marca del alimento.
- Empresa elaboradora, fraccionadora, distribuidora y/o expendedora, y razón social de la misma.
- Ingredientes según su peso, de mayor a menor, excepto que se trate de un alimento con un único ingrediente (ejemplo: sal).
- Contenido neto.
- Fecha de vencimiento. No es obligatoria para algunos alimentos tales como vinos, vinagres, azúcar, frutas y hortalizas frescas, productos de panadería y pastelería que se consuman dentro de las 24 horas de elaborados, caramelos y pastillas, entre otros.
- Modo apropiado de conservación. Uso y precauciones de su manipulación (ejemplo: descongelado de alimentos). En los envases cuyos contenidos puedan experimentar alteraciones después de abiertos, debe indicarse que el producto es de consumo inmediato, y cuales son las condiciones en que el producto debe ser conservado una vez abierto.
- Número del certificado de autorización del producto otorgado por autoridad sanitaria competente y número de inscripción de la empresa elaboradora.
- Identificación del lote.
- País de origen.
- Opcionalmente pueden incorporarse: designaciones de calidad e información nutricional aprobada ¹¹².

5. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

5.1 Técnicas de proteínas

Las proteínas han sido muy usadas como marcadores de especies, no solo para la identificación de especies de consumo humano, sino para propósitos taxonómicos. A partir de los resultados obtenidos tras la prueba, se puede comprobar la autenticidad de las especies cuando se compara con un perfil propio de la especie, es decir, la prueba se realiza utilizando a la especie auténtica ⁴⁶.

Los primeros trabajos sobre el desarrollo de técnicas para la identificación de especies demostraron que la separación de proteínas hidrosolubles por electroforesis en agarosa o almidón podrían ser usadas para este propósito. Posteriormente, las técnicas de electroforesis fueron mejorando con el desarrollo del enfoque isoelectrico y la alta resolución de las proteínas hidrosolubles patrón las cuales permiten la diferenciación de especies ⁴⁶. Las diferentes proteínas patrón pueden ser obtenidas de las mismas especies y por lo tanto dificulta la identificación y algunas veces los factores son complicados como la existencia de bandas polimórficas relacionadas entre diferentes especies ^{6,70}.

Las técnicas inmunológicas son procedimientos analíticos basados en la reacción específica entre un *antígeno* (que es la sustancia que queremos analizar) y su correspondiente *anticuerpo*. Esta técnica cuyo desarrollo se inició en el campo clínico, se ha empleado en el análisis de alimentos desde 1980 aproximadamente. Estos métodos requieren la producción en un animal de un anticuerpo frente a una proteína ajena concreta. Cuando esta molécula extraña (antígeno) se introduce en el cuerpo del animal, generalmente mediante inyección, el animal responde produciendo anticuerpos como parte de su mecanismo de defensa. Cada anticuerpo interacciona específicamente con el antígeno del animal. Así, anticuerpos producidos en contra de una proteína o grupo de proteínas en particular de una especie de pescado, puede usarse para identificar esa especie

en un procedimiento estándar de análisis mediante inmuno ensayo. La principal desventaja de este método es su escasa sensibilidad en productos procesados, puesto que los anticuerpos se producen generalmente frente a soluciones de proteínas nativas aisladas de carne cruda. Como la estructura nativa se destruye por el calor, la relación específica antígeno-anticuerpo se pierde. Sin embargo de forma general, los métodos basados en el inmuno ensayo solo son adecuados para la identificación de especies en crudo³¹.

En lo que se refiere a la identificación de especies, aunque las técnicas inmunológicas han sido ampliamente utilizadas en los productos cárnicos, apenas se han aplicado en la identificación de especies de pescado. Esto puede deberse a que la obtención de anticuerpos específicos en el caso de los pescados es más compleja, debido a la gran variedad de especies comercializadas y a las estrechas relaciones filogenéticas entre ellas⁸¹.

La técnica más representativa dentro de las inmunológicas es la de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assays*) y se caracteriza por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo. En estas técnicas uno de los elementos de la reacción inmunológica (antígeno o anticuerpo) se fija a una fase sólida, normalmente a una placa de poliestireno. La interacción antígeno anticuerpo se detecta mediante la reacción colorimétrica producida por la enzima (conjugada al antígeno o al anticuerpo) al degradar el sustrato correspondiente. La medida de la absorbancia en los pocillos de la placa, permite cuantificar la reacción inmunológica¹⁴.

La técnica de ELISA tiene dos variantes, una directa y otra indirecta.

- a) Directa: después que el antígeno es captado por el anticuerpo a la placa y se efectúa el lavado para eliminar el material no adherido, se añade un segundo anticuerpo que reacciona con el complejo anteriormente formado y que está marcado con una enzima, a la cual se le adiciona su sustrato,

después de un segundo lavado, para eliminar el exceso de este segundo anticuerpo: aquí se observa el cambio de color visualmente o se puede cuantificar por espectrometría.

- b) Indirecta: en ésta, el segundo anticuerpo no es marcado y la detección se efectúa por un tercer anticuerpo, que reconoce específicamente un epítopo del segundo ²⁸.

La *cromatografía líquida de alta resolución* (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) es un procedimiento analítico basado en la separación de moléculas, en función de su diferente polaridad ¹⁴.

La identificación de especies ha sido también realizada usando otros métodos, como el análisis de la composición química por espectrofotometría infrarrojo cercana o mediana (NIR o MIR). El nivel de identificación es realizado a través de diferencias en el contenido de grasas, proteínas y agua. Además, el problema común en la autenticación de especies de pescado es la diferenciación de especies dentro de una familia y familias de pescado que presentan una composición casi idéntica ⁶.

El uso de análisis de lípidos para la identificación de especies tuvo muy poco impacto, principalmente porque la composición de lípidos, principalmente triglicéridos, dependen mucho de la alimentación y además es bastante vulnerable. Los perfiles de las proteínas sarcoplásmicas hidrosolubles, después de la separación usando cromatografía líquida de alta resolución HPLC, han sido usados para la identificación de especies de pescado crudo. Entre las ventajas de este método esta la posibilidad de cuantificación de especies, usando diferentes sistemas de detección, como la luz UV. Otras ventajas del método son su velocidad y la reproducibilidad de perfiles. La desventaja es su limitado uso para productos frescos o congelados, la necesidad de patrones internos y externos

(material de referencia) y los problemas inherentes en la composición de perfiles específicos ⁶.

La *electroforesis* es una técnica analítica que fue introducida por el científico sueco Tiselius en 1930 que se basa en la separación de moléculas cargadas, como proteínas o DNA, en un medio acuoso, bajo la influencia de un campo eléctrico que se aplica entre los electrodos positivo y negativo a temperatura constante. Los requisitos fundamentales para la separación por electroforesis son: las moléculas en estudio deben tener carga neta, positiva o negativa, al pH seleccionado para el análisis ²⁸.

Aquellas moléculas que tengan una carga mayor, tenderán a moverse más rápidamente que aquellas con menor carga neta. En caso de que esta sea igual, las moléculas menores se desplazaran con mayor rapidez ^{14, 45}. El resultado final es la separación de los componentes de una mezcla de acuerdo a sus movilidades respectivas ²⁸. Generalmente se utilizan geles de poliacrilamida o de agarosa, dependiendo del tipo de moléculas que se vayan a separar. La identificación de especies se realiza comparando el perfil electroforético obtenido a partir de las proteínas musculares de las muestras problema, con los patrones de bandas de nuestra referencia. Normalmente, para comparar los patrones de banda es necesario analizar las muestras de referencia en el mismo gel que las desconocidas ¹⁴.

La electroforesis capilar es otra técnica que ha sido usada para la identificación de especies, la cual muestra las siguientes ventajas; bajo costo de reactivos, alto poder de resolución y eficiencia, requiere de pequeña cantidad de muestra, no necesita de solventes dañinos, detecta proteínas por espectrofotometría, bajo tiempo de análisis (10-20 min.), pero también tiene restricciones como el usar únicamente carne fresca o congelada ⁶.

Los métodos electroforéticos, sin embargo, están encaminados a la detección de proteínas en su estado natural, por lo que no es apropiado cuando se trata de productos que han sufrido tratamientos térmicos, como el ahumado o la esterilización, pues tras el tratamiento térmico las proteínas se hallan desnaturalizadas, además de que la expresión de la proteína es dependiente del tejido, lo que implica que las proteínas no puedan ser detectadas adecuadamente en procesos a través de los cuales el tejido no está disponible ⁴¹.

5.2 Técnicas de Biología Molecular

Otro método para la identificación de especies se basa en el análisis de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) con la técnica comúnmente llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual consiste en amplificar determinado número de veces el DNA en estudio en unos ciclos de temperatura, en presencia de los reactivos necesarios para la síntesis del DNA. Uno de los requisitos es tener unas pequeñas secuencias de DNA (cebadores, *primers*, iniciadores, oligonucleótidos u oligos) que se unan (hibriden) con el DNA diana, delimitando un fragmento de tamaño discreto. Generalmente se amplifican así unos 500 pares de bases (pb), aunque actualmente existen protocolos para amplificar fragmentos de hasta 50 Kpb o kilobases (Kb) ¹¹⁰.

Las moléculas de DNA pueden ser localizadas en el núcleo y en la mitocondria de los organismos eucariontes. Hay segmentos de DNA, llamados genes, los cuales poseen la información requerida para la síntesis de proteínas dentro de la célula. La cantidad de DNA total en la célula puede variar dependiendo de varias condiciones biológicas como la etapa del ciclo celular, tipo de tejido, edad, etc. El tamaño del genoma nuclear de pescados espinosos es de cerca de 0.3-4 billones de pares de bases. De las secuencias codificantes y no codificantes que abarcan el genoma, solamente el 1% del genoma total de los mamíferos codifica para

proteínas esenciales. Este hecho demuestra que es posible encontrar mucho más especies o poblaciones usando métodos basados en el DNA que usando métodos basados en proteínas, debido a que la molécula de DNA es muy estable y de larga vida. Tiene la característica de ser específica en cada especie, es decir, muestra variabilidad en su configuración inter e intraespecífica, por la simple mutación en una sola base. Esta característica es lo que hace al análisis de esta molécula, lo más adecuado para la búsqueda de autenticidad en los productos de alimentos procesados ⁵⁴.

Además, la información de la secuencia del DNA ha sido ampliada para la identificación de especies, especialmente después de los grandes desarrollos en las técnicas de biología molecular principalmente por la implementación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ⁶.

El análisis de la secuencia del producto amplificado puede ser realizado usando una infinidad de técnicas; probablemente la mayormente usada es la secuenciación. Estas secuencias del DNA tanto nuclear como mitocondrial han sido usadas para la identificación de especies.

El DNA mitocondrial ha sido mayormente usado como molécula patrón para la identificación de especies y en particular, se han utilizado diversas partes de los genes del citocromo b del DNA mitocondrial, dando lugar a una extensa base de datos que esta disponible por medio de sistemas bioinformáticos para comparar entre diferentes especies de estas familias ³¹. La razón de selección de los genes mitocondriales para llevar a cabo este tipo de estudios, es el carácter haploide de la molécula, que en el pescado tiene un tamaño alrededor de 15-20 kb ⁶.

Más adelante se hablará con mejor detalle sobre los fundamentos y requerimientos en los que se basa la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

A continuación se muestra un cuadro comparativo de las ventajas que ofrece el utilizar la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), en lugar de emplear los análisis de proteínas para la identificación y autenticación de especies. Dicho cuadro fue elaborado por el autor gracias al análisis bibliográfico realizado, lo que me permitió estructurar de manera concreta y precisa la gran funcionalidad de esta técnica.

Cuadro 1. Comparación entre los métodos basados en proteínas y los basados en ácidos nucleicos para identificación de especies.

MÉTODOS BASADOS EN EL ANALISIS DE PROTEINAS	
<p>Ventajas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rapidez en el análisis de las muestras.¹² • Menor costo de los reactivos. • Técnicas más sencillas de aprender • Amplia disponibilidad de datos para muchas especies. • Técnicas en general más baratas. • Es posible en ocasiones analizar muestras sometidas a procesos térmicos bajos. 	<p>Desventajas</p> <ul style="list-style-type: none"> • La conservación de las muestras ha de hacerse en buenas condiciones para obtener resultados reproducibles. • Se requiere gran cantidad de muestra. • El análisis de los perfiles obtenidos es bastante complejo. • Las proteínas varían (en cantidad y en tipo) dependiendo del tejido que se examine.
MÉTODOS BASADOS EN ÁCIDOS NUCLEICOS	
<p>Ventajas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se necesita muy poca cantidad de muestra (unos 100 mg de tejido) • Se pueden analizar muestras conservadas en malas condiciones durante mucho tiempo. • Es posible analizar muestras sometidas a intensos procesos e incluso esterilizadas. • Se pueden detectar mutaciones imposibles de detectar mediante análisis de proteínas. 	<p>Desventajas</p> <ul style="list-style-type: none"> • El análisis es un poco costoso. • Es una técnica relativamente compleja, que necesita por tanto de personal más especializado.

Ventajas

- El DNA es el mismo en todos los tipos celulares de un organismo.
- Permite la amplificación y análisis de fragmentos de DNA seleccionados en un tiempo relativamente corto (2 horas).⁵⁰
- El analista puede seleccionar las diferentes regiones de DNA para analizar diferentes índices de mutación inter e intra específico dependiendo de la variabilidad sobre el nivel de resolución requerido (individual, población, especie, género, familia, etc.)⁵⁰
- El DNA es más estable al calor que las proteínas en los diferentes procesos industriales.⁵⁶
- Tiene una mayor velocidad de mutación, significando más variabilidad genética y además no contiene intrones lo que permite diferenciar entre especies filogenéticamente similares.⁵⁶

Fuente: Elaboración propia con datos de los autores Céspedes 2000, Montiel 2000. Matsunaga 1999.

En conclusión, los métodos basados en la identificación de proteínas de la especie a autenticar presentan una serie de desventajas debidas principalmente a la naturaleza y estabilidad de éstas. Por otro lado, los análisis de DNA se muestran mucho más confiables para la autenticación de especies, sin embargo, lo que hace a la Reacción en Cadena de Polimerasa el método más adecuado para la autenticación de especies, es debido a que esta puede ser utilizada como herramienta para una gran cantidad de análisis.

6. DNA MITOCONDRIAL

6.1 Características

La mitocondria tuvo en el pasado un interés restringido a los estudiosos de la citología, la bioquímica metabólica y la bioenergética. Sin embargo, desde hace pocos años la mitocondria humana se encuentra en un primer plano de las ciencias biomédicas. Este cambio radical se fundamenta en varios hechos:

1) El conocimiento de un numeroso grupo de enfermedades genéticas metabólicas, entre las cuales figuran más de medio centenar debidas a mutaciones puntuales consistentes en la sustitución de unas bases por otras, afectando a distintos genes del genoma mitocondrial. A ello hay que añadir los varios cientos de mutaciones no puntuales como son reordenaciones genéticas del tipo de las deleciones o las inserciones de fragmentos de DNA de distinto tamaño. Este aspecto de la mitocondria humana ha llamado la atención de los científicos interesados en la terapia génica.

2) La utilidad del DNA mitocondrial como un marcador de gran fiabilidad en antropología molecular para el estudio de la evolución humana, los flujos migratorios, etc.

3) La bioquímica metabólica ha acrecentado los conocimientos sobre el papel central de la mitocondria en el metabolismo celular. Al mismo tiempo se han clarificado definitivamente los aspectos bioenergéticos de la mitocondria en relación con el transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y el necesario acoplamiento de ambos procesos¹¹¹.

Para entender mejor la conformación y características del DNA mitocondrial (mtDNA) a continuación se hablará del DNA humano entendiéndose que en cualquier especie animal su estructura es la misma.

La célula humana consta de 2 genomas, el nuclear y el mitocondrial. En el núcleo de la célula se localiza el primero, en donde el DNA se organiza en forma de cromosomas (46) durante la división celular. Y en la mitocondria tenemos el cromosoma 47, o genoma mitocondrial. Este es un DNA de doble cadena de cerca de 16.6Kb. Las células somáticas mamíferas contienen miles de copias de DNA mitocondrial, las cuales son sin embargo del grupo de los centenares de nucleótidos semipermeables que son dispersados por todos lados de la red mitocondrial ^{48, 21}.

En la siguiente figura podemos observar como en una célula somática tiene en su núcleo 46 cromosomas. A este número (46) se llama número diploide de la especie humana ¹¹¹.

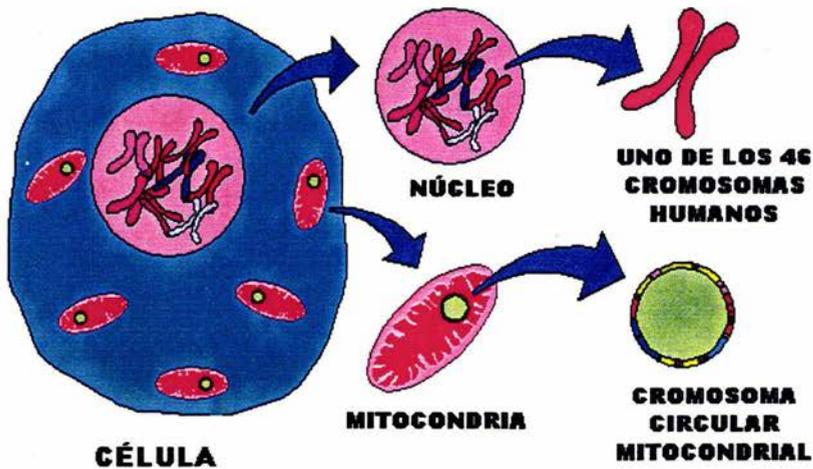


Figura 1. Conformación de una célula somática

Los cromosomas son moléculas lineales de DNA, y entre todos suman un tamaño total de 6.000 millones de pares de bases (GC y AT) constituyendo la fracción del genoma mayoritaria. De tal forma que el tamaño medio de los cromosomas

humanos es de unos 130 millones de pares de bases. Por ejemplo el genoma humano tiene un número aproximado de 30.000 a 40.000 genes ¹¹¹.

El DNA mitocondrial sólo se hereda de la madre, a partir de las mitocondrias del óvulo. Como del espermatozoide sólo entra al óvulo su cabeza, no aporta citoplasma alguno al cigoto y, por tanto, no participa en la herencia de esa fracción del DNA. En ese DNA mitocondrial (mtDNA) se incluye la información necesaria para la síntesis de las moléculas que necesita la mitocondria para producir energía ¹¹³. Cualquier cambio de él, que se trasmite de generación en generación, es sólo el resultado de mutaciones aleatorias. A su vez éstas suceden con mucha regularidad, a un ritmo de 2 a 4% por millones de años. De modo que el estudio del DNA mitocondrial y sus mutaciones se ha convertido para los investigadores en un verdadero reloj genético ¹⁰².

A pesar de tener su propio genoma, la mitocondria no es un ente autónomo dentro de la célula. Anteriormente se creyó que la mitocondria contenía alrededor de 1000 proteínas pero, en mamíferos, el DNA mitocondrial solamente codifica 13 proteínas, las cuales son todas subunidades de la fosforilación oxidativa ^{44, 86}.

6.2 Diferencias entre el DNA mitocondrial (mtDNA) y el DNA nuclear (nDNA)

Además de su menor tamaño, número de copias y disposición (el DNA nuclear es lineal), el mtDNA es un sistema génico que se diferencia del nuclear en algunos aspectos: ¹³.

- Se trata de un DNA haploide no recombinante, el mtDNA es exclusivamente de herencia materna ^{13, 75}.
- Es un DNA muy compacto y de gran eficiencia; no contiene intrones, raramente aparecen secuencias duplicadas y no hay espacios intergénicos: los genes están separados normalmente por menos de 10 pb o incluso se solapan entre sí.

- Tiene una tasa de evolución de 5-10 veces mayor que el DNA nuclear (nDNA), debido a una mayor frecuencia tanto de mutaciones puntuales como de inserciones y deleciones ¹³.
- Mayor número de copias por células

6.3 Estructura

El mtDNA de los animales comprende 13 genes que codifican proteínas, dos genes que codifican RNAs ribosómicos (rRNA 12S y rRNA 16S), 22 genes que codifican RNAs de transferencia (tRNA) y una región no codificante denominada región control en los vertebrados, que contiene los sitios de iniciación para la replicación y la transcripción. Los genes mitocondriales codifican distintas subunidades de enzimas que intervienen en la cadena transportadora de electrones: siete subunidades de la NADH deshidrogenasa (NDI, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), el citocromo b, tres subunidades de la citocromo c oxidasa (CO I, II, y III) y una o dos subunidades de la ATP sintetasa (ATPasa 6 y en ocasiones también la 8) ¹³.

Las dos cadenas de DNA mitocondrial se denominan L (ligera) y H (pesada). Su denominación responde a las marcadas diferencias existentes en las dos hebras en el contenido de G + T, lo cual determina un comportamiento diferente de ambas cadenas en los gradientes de CsCl₂. De los 7 genes estructurales que comprende el mtDNA de los vertebrados, sólo la proteína ND6 y ocho tRNA están codificados por la cadena ligera; el resto se codifica en la cadena pesada ^{84, 111}.

Otra característica importante de la expresión genética de la mitocondria es el uso de tan sólo 22 especies de tRNA, a diferencia de las 61 utilizadas en el citosol. Algunos RNAs de transferencia mitocondriales (tRNA) leen 4 tipos de codones. Las mitocondrias poseen un código genético distinto. Cuatro codones poseen funciones atípicas: AGA y AGG, que normalmente codifican arginina, son codones de terminación; AUA codifica metionina en vez de isoleucina; y UGA codifica triptófano en vez de ser una señal de terminación ⁸⁴.

La zona del DNA circular conocida como D-Loop o lazo D, aloja el origen de replicación de la cadena H, el origen de transcripción de la cadena H, y el origen de transcripción de la cadena L, además de una secuencia codificadora de RNA 7S¹¹¹.

En la siguiente figura podemos ver el mapa genético del DNA mitocondrial humano. Observamos que tiene 37 genes, que podemos agrupar por sus productos⁸⁶:

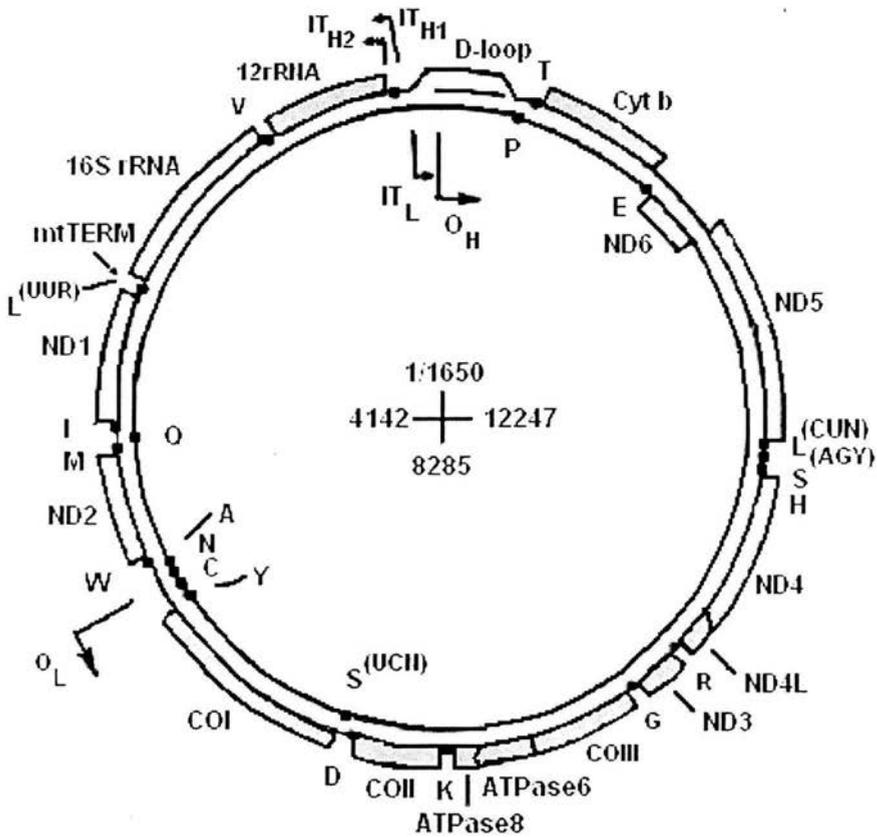


Figura 2. Mapa del genoma mitocondrial humano (16569pb).

El círculo externo representa la cadena H, que contiene la mayoría de los genes: el círculo interno representa la cadena L. La región D-loop está mostrada como una estructura de tres cadenas. Los orígenes de la replicación de la cadena H (O_H) y la cadena L (O_L) y la dirección de la síntesis de DNA están indicados por una larga inclinación de la transcripción (IT_L , IT_{H1} , IT_{H2}) y la dirección de la síntesis de RNA está denotada por una inclinación cortada de la flecha. El sitio obligatorio para la terminación de la transcripción mitocondrial está indicado como mtTERM. Los 22 genes de tRNA están representados por puntos y el código de una letra del aminoácido. Los genes codificados para las dos especies de rRNA (12S y 16S) y las 13 proteínas codificadas están representados por partes oscuras. ND, CO y ATPasa se refieren a los genes codificados por sus subunidades de NADH: ubiquinona oxido reductasa, ferrocitocromo c: oxígeno oxidoreductasa (citocromo c oxidasa) y FiFo-ATP sintetasa, respectivamente, mientras que cyt b codifica apocitocromo b de ubiquinol ferrocitocromo c oxidoreductasa⁸⁶.

La cadena sobre la que se realiza la numeración del genoma mitocondrial es la cadena L. La numeración se realiza de 1 a 16569 no existiendo, al contrario de lo que ocurre en los genes nucleares, valores negativos, como se muestra en la siguiente figura:

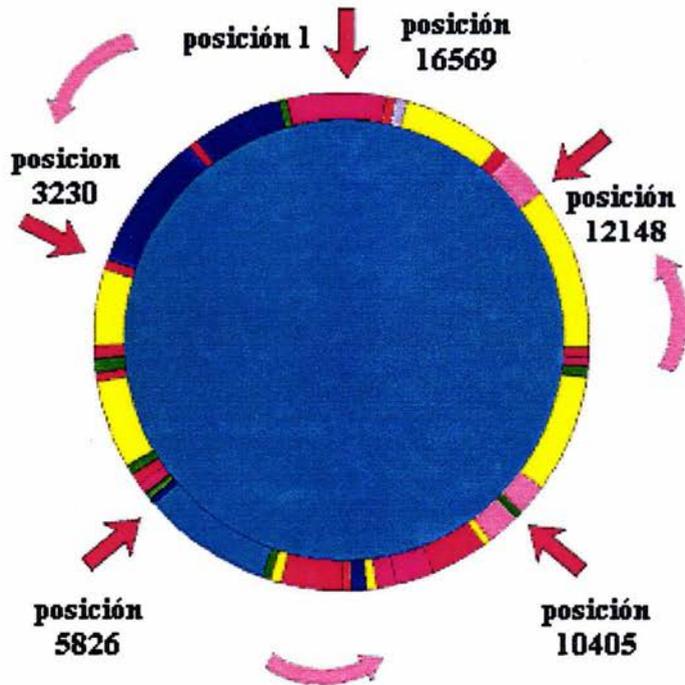


Figura 3. Forma de numeración del DNA mitocondrial (mtDNA)

Estos genes no se encuentran todos sobre la misma cadena codificadora, sino que existen genes localizados sobre ambas cadenas (H y L). La mayor parte de los genes mitocondriales son transcritos utilizando como molde la cadena H. Por lo tanto el RNA será el transcrito de la cadena H (cadena molde), mientras que la cadena codificadora de éstos genes será la cadena L. Esto lo vemos en la siguiente figura.

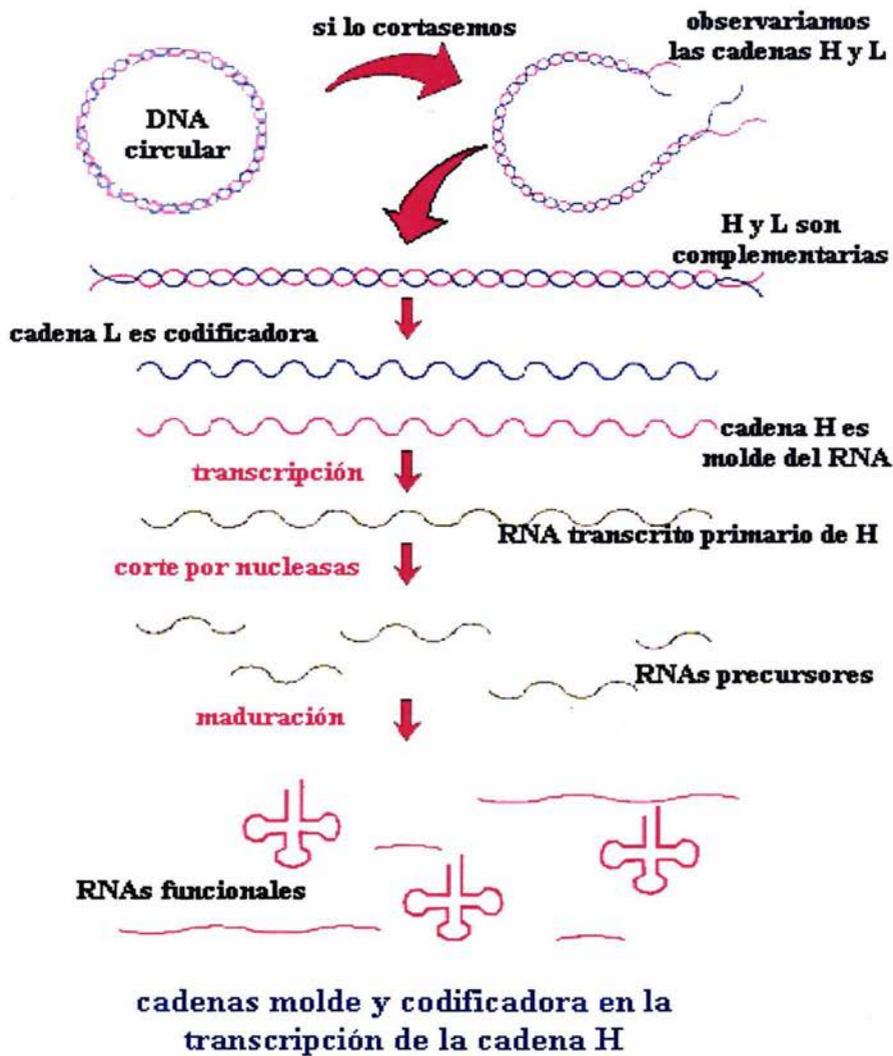


Figura 4. Proceso de transcripción

Cada cadena tiene su propio origen de replicación y de transcripción. Cada cadena se transcribe " en una sola pieza "; es decir, se produce una sola molécula de RNA al que se denomina transcrito primario de esa cadena, como se muestra a continuación ¹⁰⁹.

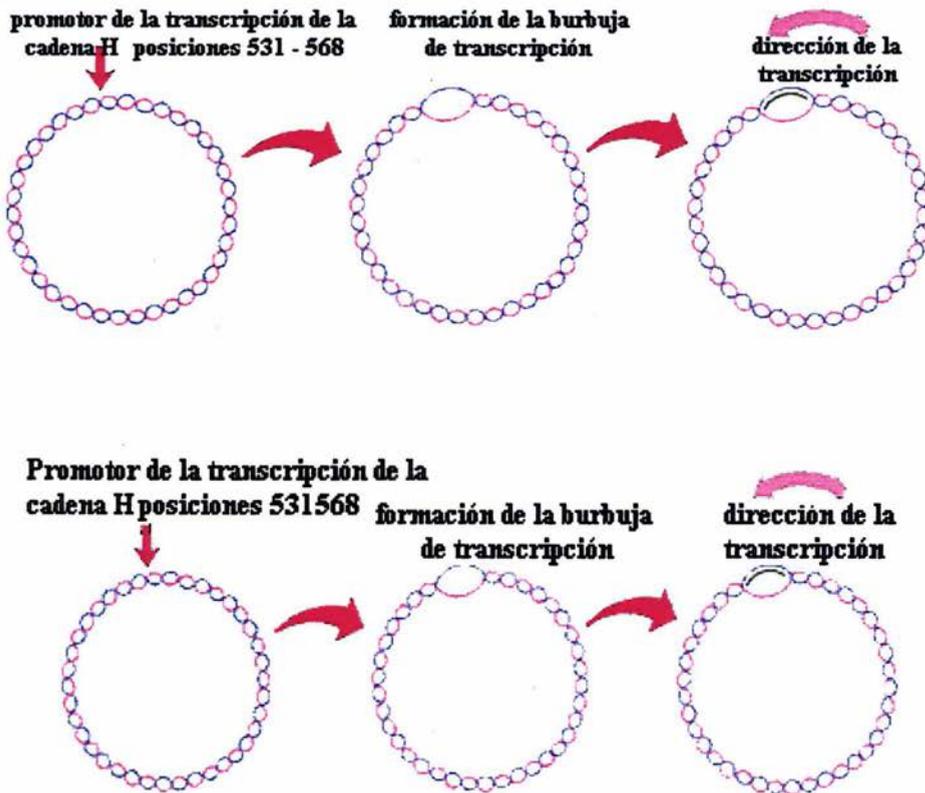


Figura 5. Inicio de la transcripción de RNA

El promotor de la transcripción de la cadena H se encuentra entre las posiciones 531 y 568. Este promotor dirige la formación del complejo de transcripción que formará la burbuja donde se sintetiza el RNA denominado transcrito primario de la cadena H, viéndose de la siguiente manera.

prosigue la formación del transcrito primario de la cadena H



Figura 6. Formación del transcrito primario

El transcrito primario de cada cadena sufre un proceso de corte por acción de nucleasas (RNAsas) muy específicas, que producen una colección de RNAs. Estos RNAs reciben el nombre de "precursores", y no son funcionalmente activos. Para ser funcionales deben sufrir un proceso de maduración, como lo muestra la siguiente figura ^{86, 109}.

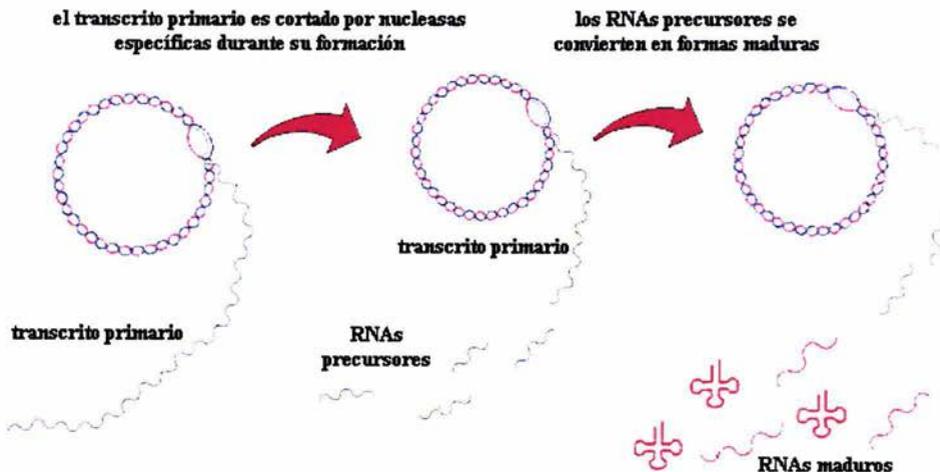


Figura 7. Formación de RNAs maduros

Estos RNAs " precursores " sufrirán procesos de maduración consistentes en transformaciones catalizadas enzimáticamente, y originarán las formas maduras de los tRNAs, mRNAs, rRNAs y RNA-7s.

Los denominados genes transcritos de la cadena H tienen como cadena codificadora la cadena L; por ello la secuencia de los RNAs transcritos de la cadena H tienen la secuencia y dirección que se asigna por convenio al conjunto del genoma mitocondrial, y las ORFs (*marcos de lectura: Open Reading Frames*) tienen esa misma dirección. Es decir, estos genes tienen como cadena codificadora la cadena L, y como cadena molde la H. Y en el caso de los genes transcritos de la cadena L tienen como cadena codificadora la cadena H, dándose un proceso inverso.

Esto hace que el número de genes transcritos por la cadena H sea de 12 codificando para proteínas, 2 codificando para RNAs ribosómicos, y 14 codificando para RNAs de transferencia. Dando como resultado 28 genes. Y los genes transcritos de la cadena L son de 1 codificando para proteínas, y 8 codificando para RNAs de transferencia. Ello totaliza 9 genes de los 37 que tiene la mitocondria humana ¹⁰⁹.

Es importante hacer notar que el DNA mitocondrial (mtDNA) tiene una tasa de evolución mayor que la del DNA nuclear (nDNA). Sin embargo, no todos los genes mitocondriales acumulan mutaciones con la misma velocidad. La región control es la zona con mayor tasa de evolución. Los genes que codifican proteínas evolucionan más lentamente que aquellos que codifican tRNA y rRNA. En los genes que codifican proteínas producen sobre todo sustituciones en la tercera base de los codones, siendo mucho más frecuentes las transiciones que las transversiones. En la mayoría de los casos dan lugar a mutaciones silentes. Aparecen muy pocas deleciones y adiciones de nucleótidos, que son más frecuentes en la región control y en los genes que codifican tRNA y rRNA. Aunque

cada gen en particular tiene su propia tasa de evolución, los genes que codifican las distintas subunidades de la CO y el citocromo b son los más conservados, mientras que los que codifican las distintas subunidades ND y ATPasa son las que más varían. La región control, especialmente la zona denominada D-loop, es la parte del mtDNA con mayor tasa de evolución. Esta mayor tasa se debe sobre todo a sustituciones, adiciones y deleciones, siendo la zona responsable de las variaciones en longitud que presenta el genoma mitocondrial de los distintos vertebrados ^{13, 52}.

Debido a esta mayor tasa de evolución con respecto al DNA nuclear (nDNA) es que se han realizado estudios con el DNA mitocondrial (mtDNA) para la identificación y autenticación de especies, lográndose identificar entre especies filogenéticamente cercanas. Por otro lado las diferencias más notables entre ambos códigos genéticos (mtDNA y nDNA) en los vertebrados, incluyen la utilización del codon TGA como Triptófano (en lugar de codon de terminación) y el codon ATA como metionina en lugar de isoleucina. El código genético mitocondrial requiere a su vez la presencia de un menor número de tRNA. De hecho normalmente se suelen encontrar sólo 22 tipos de tRNA en la mitocondria en lugar de los 24 que serían necesarios. Ello puede deberse a que los codones AGA y AGG no se utilicen como arginina sino como codones de terminación en los mamíferos y en los anfibios. Es frecuente a su vez que algunos genes mitocondriales carezcan de un codon de terminación completo, por ejemplo TAA, terminando simplemente en T o en TA ¹³.

El uso del mtDNA en la técnica de PCR para la identificación de especies ofrece una serie de ventajas: Primero, los genes del DNA están presentes en miles de copias por célula, lo cual mejora la posibilidad de amplificar fragmentos de mtDNA , segundo, el conocimiento de la organización del genoma mitocondrial, además de la disponibilidad de secuencias reportadas de muchas especies, hacen posible

la fácil diseño de *primers* específicos de amplificación, tercero, la gran variabilidad del mtDNA permite la correcta identificación de especies en mezcla ⁵⁶.

6.4 Disponibilidad y su evaluación de secuencias de DNA mitocondrial en sistemas bioinformáticos

Un factor importante que hay que tomar en cuenta antes de realizar un análisis por medio de la técnica de PCR, es saber si la región del DNA de la especie a amplificar ha sido previamente estudiada y secuenciada o si existen en la literatura estudios en los que se haya trabajado con dicha especie y en la que nos indique su secuencia o al menos aquellas zonas en las que se van a unir los cebadores (*primers*). Esto, en principio podría suponer un obstáculo a la hora amplificar DNAs desconocidos, pero actualmente se ha conseguido resolver siguiendo distintos caminos. Por un lado se pueden utilizar las secuencias génicas de diversas especies conocidas para buscar regiones conservadas sobre las que diseñar cebadores denominados universales que permitan la amplificación del mismo gen en una gran variedad de especies. En otras ocasiones, es posible conocer la secuencia aminoacídica de la proteína que codifica un determinado gen. En estos casos se pueden diseñar cebadores que amplifiquen dicho gen basándose en el empleo de codones de la especie que estamos estudiando y en posibles homologías con genes similares que hayan sido secuenciados en otras especies ³.

53

Para seleccionar adecuadamente la región del genoma que se debe amplificar es preciso tener en cuenta varias premisas ⁴:

- Debe acumular mutaciones con suficiente rapidez para que organismos estrechamente relacionados tengan diferentes secuencias nucleotídicas, pero con la suficiente longitud para que la variación intraespecífica no sea importante.

- El tamaño del segmento de DNA ha de ser lo bastante largo para detectar diferencias en la secuencia entre especies próximas pero suficientemente corto para poder secuenciarla en un gel estándar de secuenciación.
- Debería elegirse un gen que codifique una proteína. De este modo los errores de amplificación y/o secuenciación pueden detectarse traduciendo la secuencia aminoacídica.
- La existencia de secuencias del gen seleccionado en las bases de datos correspondientes a otros organismos sería de gran interés, ya que nos permitiría comparar dichas secuencias con las obtenidas en nuestro estudio ¹³.

El análisis de secuencia obtenidas suelen requerir la utilización de programas informáticos complejos (árboles filogenéticos). Sin embargo la gran importancia que esta adquiriendo la identificación de especies ha hecho que se diseñen otros programas informáticos más específicos, que ya no estén basados en la construcción de árboles filogenéticos, sino en la elaboración de matrices de valoración de distancias genéticas entre secuencias, como los anteriormente mencionados ⁵⁴.

Por esta razón un factor clave para la expansión de la técnica de PCR ha sido la creciente disponibilidad de cebadores específicos, posibilitada por los avances en las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos que han permitido conocer las secuencias de un número considerable de genes, y que actualmente están disponibles en bases de datos que pueden ser consultados y analizadas con la ayuda de programas bioinformáticas que permitan investigaciones en diferentes especies.

La bioinformática es una aplicación que facilita el análisis de datos complejos de las secuencias del genoma para ordenar el análisis de datos. No se restringe únicamente a aquellos generados como parte del proyecto genoma, cobija igualmente estudios en ecología y pretende brindar una herramienta al biólogo a

través de la cual él pueda afrontar la integración coherente de grandes cantidades de datos, y permitir la organización del conocimiento en si mismo. Hasta el momento su área de mayor desarrollo ha estado ligada a la información proveniente de los distintos proyectos genoma, es así como dentro de las áreas que más apoyo y demanda tienen podemos citar:

1. Bases de datos
2. Software para visualización de estructuras moleculares
3. Sistemas de manejo integrado de laboratorios a nivel de industria Farmacéutica.
4. Software para estudios de redes genéticas (Genetic Networks)
5. Desarrollo de nuevos algoritmos para estudios de estructura proteica

El análisis de las secuencias obtenidas suele requerir la utilización de programas informáticos complejos, y gracias a estos programas se puede llevar a cabo la autenticación de especies en muestras (siempre que en la base de datos haya secuencias correspondientes a las especies que se pretende identificar), así como se pueden establecer relaciones filogenéticas entre especies.

Cuando se quiera hacer un análisis de PCR primeramente se tienen que establecer las especies que van a ser determinadas y si su secuencia o parte del DNA es conocido y disponible ya sea por medios informáticos (artículos) o por medios bioinformáticos (base de datos). De esta manera se pueden seleccionar los cebadores que sean específicos de la especie y que por lo tanto no amplificarán otra especie. Después de que se tiene la secuencia de la especie a amplificar se puede hacer uso de otro programa bioinformática para saber si esta secuencia tiene alguna similitud con otras especies que provoque una amplificación errónea.

Una de las ventajas de emplear programas bioinformáticos radica en la facilidad con la que se puede obtener información acerca del DNA a amplificar y poder hacer un buen diseño de primers. A continuación se dan algunos de estos

programas bioinformáticos que pueden ser empleados previos a un análisis de PCR.

Algunas de las páginas que pueden ser utilizadas para el análisis de fragmentos de DNA mitocondrial son:

- **www.mitomap.org** Este programa es de gran utilidad debido a que por medio de él se puede saber la disponibilidad de secuencias de la especie que se pretenda amplificar, así como de las características de cada una de las regiones.
- **www.ebi.ac.uk/fasta33** Fasta es una base de datos que nos ayuda a saber si los *primers* que previamente se diseñaron para la especie en estudio tienen alguna similitud con otras especies y en qué proporción, facilitándonos de esta manera un correcto diseño de *primers* en el cual sólo nos amplifique la especie de nuestro interés, o identificar alguna relación filogenética entre varias especies.
- **www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST** Finalmente BLAST es otro programa bioinformático al que se puede recurrir para saber exactamente las diferencias que existen entre una y otra especie en un análisis de PCR.

7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El método de PCR fue realizado y nombrado por Millus y colegas de la corporación CETUR, aunque la principal ha sido descrita y detallada por Khorona y colegas. El uso de PCR se vio limitado hasta que se dispuso de una enzima termoestable (enzima DNA polimerasa) la cual lleva a cabo la síntesis de una cadena complementaria de DNA en la dirección 5'-3' usando una cadena sencilla como patrón, pero comenzando desde una cadena doble. Esta es la reacción de extensión de *primers* y es la base para una variedad de técnicas de autenticación y secuenciación.

La PCR usa el mismo principio, pero emplea dos *primers*, para cada cadena de la región del DNA (la complementaria y la opuesta), las cuales han sido desnaturalizadas por calentamiento. Los *primers* son arreglados de tal manera que cada reacción de extensión del *primer* sintetiza el DNA de la otra dirección. De esta manera el *primer* "a" sintetizará directamente una cadena de DNA la cual puede entonces ser cebado por el primer "b" y viceversa ⁵¹.

7.1 Fundamento

La técnica de PCR es un método *In Vitro* de síntesis de ácidos nucleicos por el cual un segmento particular de DNA es especialmente replicado, delimitado por dos *primers* o iniciadores que indican el comienzo de la secuencia a replicar, la cual se somete a repetidos ciclos de desnaturalización, alineación y extensión con la enzima *taq polimerasa*. Esta enzima es capaz de convertir una molécula de DNA de cadena doble en dos moléculas idénticas de doble cadena también. Para ello necesita que el DNA se desnaturalice, oligonucleótidos que actúen como iniciadores y los nucleótidos precursores ^{98, 100}.

Se parte de una sola molécula de DNA. Al elevar la temperatura a unos 92°C, se produce la separación (*desnaturalización*) del DNA. Posteriormente se reduce la temperatura (p.ej., 55°C), de forma que, antes de que el DNA diana pueda renaturalizar, se produce la hibridación de los *primers* que van a delimitar el fragmento a amplificar. Los *primers* son secuencias previamente sintetizados (y por tanto, conocidas) de unas 20 a 30 bases. En el siguiente paso se eleva la temperatura (p.ej., 70°C), de forma que la enzima DNA polimerasa termoestable presente en el tubo de reacción pueda sintetizar las correspondientes cadenas de DNA a partir de los moldes existentes. Este mismo proceso se repite varias veces (típicamente, entre 20 y 40), como se muestra la figura 8¹⁰⁰.

7.2 Etapas de PCR

Como se puede ver en la figura antes mencionada, la Reacción en Cadena de la Polimerasa consiste en la repetición cíclica de tres etapas ¹⁰⁸:

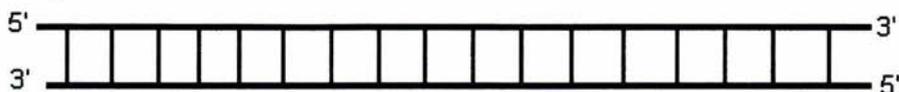
7.2.1 Desnaturalización

La desnaturalización se debe tanto a la ruptura de los puentes de hidrógeno entre pares de bases, como de las interacciones hidrofóbicas entre bases apiladas al desnaturalizarse, las dos hebras del DNA se separan y pasan a una conformación al azar sin que se altere la estructura primaria, pues no hay ruptura de enlaces covalentes.

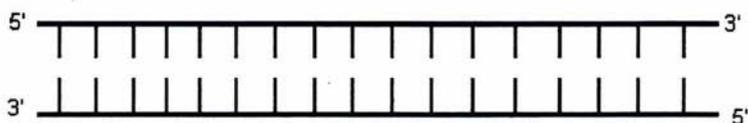
Esta etapa se lleva acabo por efecto de agente químicos desnaturalizantes o por calentamiento, que es lo más adecuado para la técnica de PCR, generalmente a temperaturas mayores de 68°C y menores de 97°C. La temperatura e desnaturalización debe ser superior a la de fusión (T_a) de la región de DNA que se desea amplificar ⁴².

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

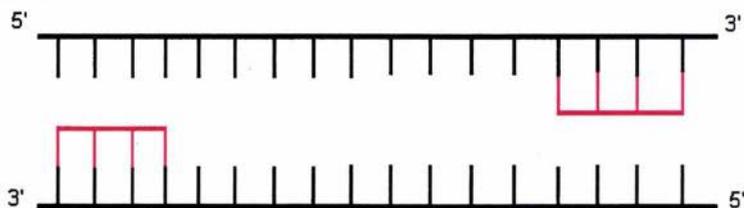
DNA patrón



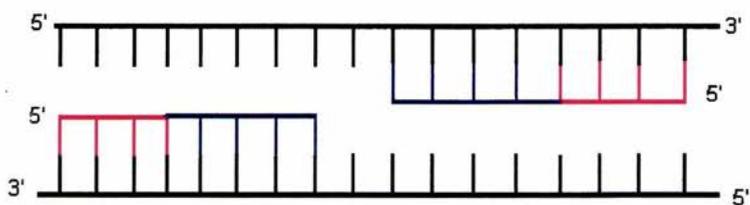
Desnaturalización



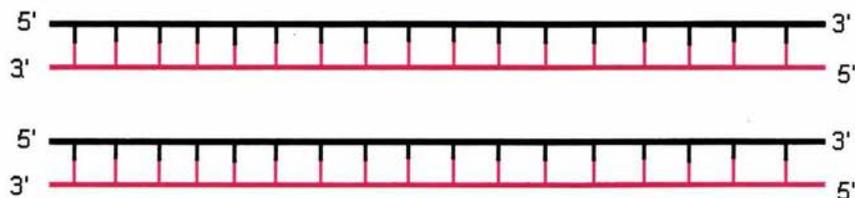
Hibridación



Elongación



Formación de nuevas cadenas



— Primer

— Enzima Taq polimerasa

Figura 8. Amplificación *in Vitro* de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

7.2.2 Hibridación

En esta etapa las hebras sencillas se unen a los oligonucleótidos sintéticos que servirán para iniciar la reacción.

Esta etapa también se denomina templado debido a la disminución de temperatura que permite la reasociación de hebras sencillas tras la desnaturalización térmica; en inglés *annealing*. Los oligonucleótidos se unen a una región específica y complementaria del DNA original en dirección 5' – 3'.

Esta etapa requiere un enfriamiento rápido por debajo de la temperatura de *annealing* (T_a) de los oligonucleótidos de forma que suceda la hibridación. Las temperaturas usadas están en un rango de 37 y 65°C por 10 a 20 segundos ⁴¹.

- La temperatura a la que se realiza esta unión (T_a , Temperatura de Annealing o alineamiento) es muy importante para controlar la especificidad de la reacción. La Temperatura de annealing (T_a) depende de la composición de las bases y del tamaño de los *primers*. Normalmente se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula: $T_a = \{2(A+T) + 4(G+C) - 5\}$. Cada *primer* se une a una cadena diferente delimitando la secuencia diana que se desea amplificar.

7.2.3 Elongación

Esta etapa también es llamada extensión, replicación o polimerización. La DNA polimerasa se encarga de alargar los oligonucleótidos de acuerdo con la hebra sencilla de DNA que en este caso sirve de molde para generar una nueva cadena doble de DNA. El sustrato de la enzima son los cuatro deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs).

La replicación se lleva a cabo en la dirección 5' – 3' a partir del extremo 3'-OH de cada *primer*, hasta terminar la lectura de la plantilla o hasta que comience una nueva etapa de desnaturalización ⁴¹.

- Se utilizan enzimas termoestables como la *Taq* polimerasa, procedente del microorganismo *Thermus aquaticus*¹⁰⁸.

Al finalizar esta etapa se obtienen cadenas dobles nuevamente, duplicando a las que existían al principio de la desnaturalización. En un primer ciclo las cadenas nuevas no tienen un tamaño especial, sin embargo, este se irá afinando conforme lo ciclos progresen.

Complementariamente a las tres etapas repetidas cíclicamente, se añade una etapa inicial y una final. La inicial implica elevar la temperatura a un nivel superior a la etapa de desnaturalización, logrando la inactivación de proteasas y nucleasas de la muestra, asegurando también la completa desnaturalización del DNA inicial. La etapa final consiste en la prolongación de la última elongación a fin de permitir que se completen todos los fragmentos⁴¹.

Dichas etapas se pueden esquematizar de la siguiente forma:

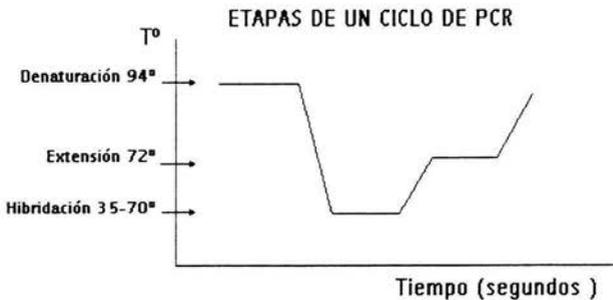


Figura 9. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Teóricamente, el DNA patrón puede estar presente como una molécula simple para iniciar la amplificación. Los 2 *primers* son diseñados para unirse específicamente a las dos cadenas complementarias del DNA patrón y están presentes en exceso a una concentración entre 0.1 y 1.0 μ M cada uno. El DNA patrón se desnaturaliza a una temperatura aproximada de 92-95°C, dando una cadena simple. Como la reacción es enfriada a 55°C, la alta concentración de *primers* conduce a un rápido annealing (hibridación) entre los dos *primers* y su respectiva secuencia complementaria, alcanzando la mitad de saturación de las cadenas del DNA patrón en segundos. Las enzimas DNA polimerasas pueden reconocer a su *primer* patrón complejo y utilizar los deoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) para iniciar la síntesis de una cadena complementaria de DNA extendiéndose del final de 3' de los *primers* A y B. El producto dominante de esta reacción será DNA de doble cadena con una longitud de 5' a 3'. Esta molécula es referida como el "*amplicon*". Para llevar a cabo un número suficiente de ciclos, el DNA patrón se multiplicará hasta una concentración de *amplicon* que alcanzará aproximadamente de 10-100nM. Esta meseta se alcanza debido a la combinación de un número de factores los cuales incluyen (1) cantidad limitante de DNA polimerasa (normalmente cerca de 10^{11} - 10^{12} moléculas), (2) la disminución en la actividad de la DNA polimerasa debido a la exposición repetida a altas temperaturas, y (3) la competencia de hibridación de su complementario ³¹.

En cada ciclo de amplificación se duplica el número de DNA obtenidos del ciclo previo. Además, se observa que a partir del tercer ciclo es cuando comienzan a generarse los fragmentos discretos delimitados exactamente por la pareja de oligos. Estos -y sólo éstos- serán los mayoritariamente amplificados en los sucesivos ciclos. El resto de los fragmentos se amplificarán de forma aritmética (lineal); no geométrica (exponencial o logarítmica). De forma que, al final de la reacción, dichos fragmentos discretos (de tamaño definido por ambos *primers*) representarán la totalidad de los amplicones generados.

Se puede deducir que, en ausencia de factores limitantes, el número de copias "N" generadas de una secuencia determinada tras "n" ciclos de PCR, responde a la fórmula:

$$N = 2^n$$

Por tanto, esta fórmula nos indica que 20 ciclos serían suficientes para generar más de un millón de copias de DNA a partir de una única molécula inicial. Y que 30 ciclos producirían más de mil millones de copias. Se trata de una curva de crecimiento logarítmico; es una amplificación exponencial. Esta es en esencia la base del tremendo potencial de PCR ^{108, 110}.

7.3 Condiciones de reacción

Para tener un resultado exitoso se requiere, primeramente, que los *primers* usados estén bien unidos en los puntos deseados. La unión correcta de los *primers* a la secuencia deseada está en función de la designación del mismo (secuencia y longitud) y las condiciones de reacción (especialmente la concentración de Magnesio y la temperatura). La especificidad y pureza del producto final depende de la frecuencia con la cual ocurren las reacciones de extensión y de la unión del *primer* en la posición deseada en el DNA patrón.

La selección de tiempos, temperaturas y número de ciclos depende del DNA que será amplificado y de la selección de *primers*. Los volúmenes de reacción que generalmente se usan son de 10-100 μ L. Volúmenes pequeños son una desventaja para lotes de investigación de grandes números de muestra, debido a los costos de reactivos, pero si solamente algunas muestras serán procesadas es más fácil trabajar un volumen de reacción ligeramente grande de 25-50 μ L. En el caso de amplificar plásmidos insertados, 100 μ L pueden ser más útiles. Las concentraciones de *primers* son generalmente de 25-100 pmol de cada uno para

una reacción de 50 μ L. Los tiempos de incubación podrían ser tan cortos como sea posible, para reducir el tiempo total del ciclo y minimizar el riesgo de una amplificación no específica. Los tiempos de desnaturalización y *annealing* de 30s podrían ser adecuados y el tiempo de extensión el cual permite 1 min., por kilobase de DNA patrón seguido por un aumento en el tiempo de incubación final (2 min., por kilobase) más que suficientes. El número de ciclos requeridos depende de la abundancia del DNA patrón y la eficiencia de PCR; para la amplificación de inserción de plásmidos, 20 ciclos son suficientes, para otras aplicaciones más ciclos pueden ser necesarios ⁵¹.

7.4 Requerimientos de la reacción

Los requerimientos de la reacción son simples: deoxinucleótidos para suministrar la energía y nucleótidos para la síntesis de DNA, enzima *Taq polimerasa*, *primers*, DNA patrón y un buffer que contenga magnesio. Los deoxinucleótidos y los *primers* están presentes en grandes cantidades, así el paso de la síntesis puede ser repetido por calentamiento separando nuevamente las cadenas de DNA sintetizado y enfriar para permitir que los *primers* se alineen a su secuencia complementaria. Esta enzima termoestable tiene dos grandes ventajas; la primera es que no se requiere reponer después de cada calentamiento y de esta manera simplifica el proceso y , segundo, la enzima es activa en altas temperaturas donde el *annealing* de los *primers* de oligonucleótidos son más específicos y la síntesis de DNA es más rápida. Por lo tanto la automatización de PCR usando la DNA polimerasa termoestable es técnicamente más fácil y más grande, generando productos de reacción más específicos. El número de ciclos requeridos para una amplificación óptima varía dependiendo de la cantidad de material de inicio y la frecuencia de cada paso de amplificación. Generalmente, 25 a 35 ciclos deberían ser suficientes para producir 100ng - 1 μ g de DNA de una secuencia humana de 50 ng de DNA genómico ⁵¹.

Un factor importante en la reacción son los nucleótidos sintéticos que no forman ninguna secuencia al inicio de la reacción, es decir, son el sustrato de la enzima DNA polimerasa y serán los componentes de miles de copias del fragmento diana al final de la reacción. Pueden denominarse como dATPs, dGTPs, dCTPs y dTTPs⁷⁸.

Cada *primer* es una secuencia corta (generalmente 20 pares de bases) de DNA de cadena sencilla complementaria a la contraparte del gen a amplificar. Deben ser complementarios para diferentes cadenas de DNA. Si los *primers* son idénticos a la otra cadena de DNA, la reacción no se realizará⁶⁴.

Una de las variables en la reacción de PCR es la concentración de magnesio y esta relacionada con la especificidad y el rendimiento. La concentración de magnesio afecta a la reacción en altas y bajas concentraciones. A muy altas concentraciones de magnesio estabiliza el DNA de doble cadena e impide la desnaturalización completa del producto en cada ciclo, reduciendo el rendimiento. También puede producir un falso *annealing* del *primer*, acumulándose en sitios incorrectos, resultando una gran cantidad de productos indeseables y de baja especificidad. Por otro lado a muy bajas concentraciones de magnesio (menos de 0.5 μ M) perjudica la reacción de extensión ya que el magnesio es un cofactor requerido para la actividad enzimática de la mayoría de las DNA polimerasas. Para regiones con un contenido muy alto de GC solamente un rango muy bajo de concentración de magnesio permite rendimientos aceptables de productos suficientemente específicos. Además de la concentración de magnesio, el medio ambiente iónico proporcionado por el buffer es también crítico. Los buffers de KCl han sido muy usados y probablemente son adecuados para la mayoría de los ensayos de PCR. Un DNA rico en GC muestra un incremento en la especificidad cuando amplifica en buffers basados en NaCl, probablemente porque la desnaturalización es más completa. Los buffers que contengan sulfato de amonio

reducen la cantidad de productos extendidos incompletos generados durante el PCR con *Taq polimerasa* ¹⁰⁸.

Otro punto importante es el pH de la solución de la reacción. La mayoría de las soluciones de reacción son amortiguadas con 10-15 mM de Tris-HCl a pH 8.3. Por otro lado, el pH decrecerá con el incremento de temperatura. En el rango de temperaturas que con frecuencia se usa para PCR, el pH del ciclo estará entre 6.8 y 7.8.

Deben evitarse DNA polimerasas en exceso ya que puede sintetizar DNA de interacciones de primers falsos. La cantidad sugerida de *taq polimerasa* en la mayoría de los protocolos es de 0.5 U por 25 μ L de reacción. Deben evitarse concentraciones de más de 2.5nM de enzima (1.25 U por 25 μ L de reacción). Para estabilizar la enzima durante el ciclo térmico, la reacción buffer debería contener gelatina a una concentración final de 0.01% (w/v) y Triton X-100 a una concentración final de 0.1% (v/v) ¹⁰⁸.

7.5 Detección y análisis de los productos de reacción

El producto de la reacción de PCR podría ser un fragmento o fragmentos de DNA de tamaño definido. El camino sencillo para comprobar esto es mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es una sustancia fluorescente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del DNA, posibilitando su visualización cuando se ilumina con luz ultravioleta. Cuando los fragmentos esperados son de un tamaño muy pequeño se pueden emplear también geles de poliacrilamida ¹⁰⁸.

El producto debería ser fácilmente visible bajo luz UV. Pequeños productos de DNA y algunas veces los mismos *primers* pueden ser visualizados como algunas bandas difusas en el gel, pero los productos deberían aparecer como una banda intensa a el tamaño esperado. Las bandas adicionales pueden ser debidas a

primers no específicos, lo cual ocurre por una variedad de razones, o a la presencia de algunos productos de cadena sencilla, lo cual puede ocurrir si los *primers* están presentes en iguales cantidades. En realidad la producción de DNA de cadena sencilla por el uso deliberado de diferentes concentraciones de *primers* es conocido como PCR asimétrico y puede ser útil para plantillas de secuenciación o pruebas específicas de cadena ⁵¹.

Cuando se trabaja con muestras complejas, es importante tener un procedimiento de lisis (corte) rígido que no introduce errores debido a lisis diferencial. Es también de importancia para investigaciones a gran escala que los métodos son sencillos y pueden ser automatizados. La razón de purificar el DNA es remover sustancias que puedan interferir con las reacciones enzimáticas para generar una preparación de DNA produciendo resultados analíticos reproducibles ^{25, 35, 73, 78}.

Más adelante se hablará a detalle sobre la técnica de electroforesis para el análisis de los productos de PCR.

7.6 Ventajas de PCR

- La técnica es rápida: una amplificación experimental puede ser completada dentro de varias horas. Los procedimientos de amplificación de DNA por PCR usando pruebas de ácidos nucleicos o por digestión de las enzimas de restricción pueden ser completadas en un día.
- PCR puede ser muy tolerante de la purificación del DNA patrón que es usado para la amplificación.
- PCR ha sido aplicado con éxito para transcriptasa reversa (RT) derivado del DNA complementario (cDNA), fundamentalmente extendiendo la cadena de sustratos de PCR a RNA patrón ³¹.
- El proceso se realiza fuera de la célula; por ello representa una verdadera "clonación in Vitro". La consecuencia más inmediata es que la técnica de PCR

acelera muchísimo los protocolos clásicos de clonación, abriendo además las puertas a metodologías de análisis completamente nuevas, basadas en dicha tecnología ¹¹⁰.

* Gracias al gran poder de amplificación, el uso de PCR permite obtener cantidades manejables de DNA (teóricamente tanto como queramos) a partir de, en caso extremo, una única molécula de DNA inicial ⁹⁸.

7.7 Desventajas de PCR

La técnica de PCR presenta sin embargo una limitación: es necesario conocer parte de la secuencia que se quiere amplificar, al menos aquellas zonas en las que se van a unir los *primers*. Este obstáculo se ha logrado resolver siguiendo distintos caminos. Por un lado se pueden usar las secuencias génicas de diversas especies conocidas para buscar regiones conservadas sobre las que diseñar *primers* denominados universales, que permitan la amplificación el mismo gen en una variedad de especies ^{4, 53}.

En otras ocasiones, es posible conocer la secuencia aminoacídica de la proteína que codifica un determinado gen. En estos casos se pueden diseñar *primers* que amplifiquen dicho gen basándose en el empleo de codones de la especie que estamos estudiando y en posibles homologías con genes similares que hayan sido secuenciados en otras especies ⁸⁹.

7.8 Aplicaciones

- En el terreno del diagnóstico microbiológico de las enfermedades infecciosas no virales, la técnica de PCR detecta directamente en diferentes tipos de muestras, patógenos tradicionalmente difíciles de cultivar tales como, *Clamidia*, *Legionella* y *Micoplasma* y/o aquellos que requieren de largos periodos para su desarrollo *in Vitro* y/o que se encuentra en muy baja concentración en los líquidos

biológicos como es el caso del *Mycobacterium tuberculosis*, enfermedad en la que muchas veces el tratamiento empírico tiene que iniciarse antes del diagnóstico definitivo, apoyándose únicamente en el cuadro clínico. En el laboratorio, mediante el uso de PCR se puede identificar en una pequeña muestra biológica al *Mycobacterium tuberculosis*, en tan sólo 4 horas, en lugar de las 6 semanas que toman las técnicas del cultivo convencionales con una gran sensibilidad y una especialidad muy similar ¹⁰⁷.

- En virología, esta tecnología nos permite identificar al agente infeccioso ¹⁰⁷.
- En otro campo, grandes progresos, han llevado a la identificación de los defectos genéticos responsables de diferentes entidades. Entre ellas, tenemos la distrofia muscular de Duchenne y la fibrosis quística. En este último caso el gen causante fue identificado en 1989, y hasta entonces, no había información sobre la base bioquímica de la enfermedad. También se ha introducido el uso de PCR para el estudio del complejo mayor de histocompatibilidad que son los antígenos HLA, especialmente, los de la región HLA-D conocidos en la actualidad como moléculas HLA de clase II. Con ello, se puede realizar pruebas de paternidad y la identificación de tejidos ¹⁰⁷.

En la industria de alimentos puede ser de vital importancia para la identificación de posibles adulteraciones, así como de reconocer diferentes especies que pueden ser filogenéticamente similares. Actualmente, por medio de esta técnica se han desarrollado muchos estudios en varios tipos de alimentos pues son de gran ayuda en la identificación de especies alimentarias aún si han sufrido algún cambio físico, como lo es en el caso de los alimentos procesados.

En general la técnica de PCR es de gran ayuda para cualquier grupo de alimentos incluso en alimentos que han sido modificados genéticamente, aunque la mayor aplicación de esta técnica en la industria alimentarias es en el sector pesquero debido a la gran variedad de especies que se comercializan en todo el mundo

incluyendo especies no conocidas los cuales pueden ser etiquetados con el nombre de otra especie. Gracias a esta novedosa y sensible técnica es posible identificar alimentos dentro de un mismo género es decir, filogenéticamente similares lo cual es de gran importancia en productos pesqueros o en especies como el jabalí y el cerdo.

Otra de sus aplicaciones en la industria de alimentos es en la identificación de patógenos (priones, viroides, virus, microorganismos) debido a la rapidez de los análisis pues anteriormente se utilizaba la siembra del cultivo lo que generaba mucho tiempo de incubación y análisis.

8. DISEÑO CORRECTO DEL *PRIMER* O CEBADOR

8.1 Utilidad del *primer*

El *primers* sirve de punto de anclaje para la DNA polimerasa y como promotor del inicio de la reacción de replicación del DNA. En el laboratorio se usan *primers* para iniciar reacciones de replicación del DNA en los puntos deseados de una muestra, normalmente con el fin de realizar reacciones de secuenciación dirigida o para amplificar el número de copias de una muestra de DNA (PCR) ¹⁰⁵.

Debe tenerse especial cuidado en el diseño de un *primer* específico que pretende ser utilizado para una reacción de secuenciación debido al significativo efecto que éste tiene en la calidad de los datos de secuencia obtenidos ¹¹⁴.

Es importante resaltar que el diseño correcto y optimizado de los *primers* es uno de los factores clave en el éxito de la técnica de PCR. Deben tener una energía libre (AG'o) del pentámero 3' de -8'5~-l Kcal/mol y temperaturas de fusión (calculadas por el algo-ritmo del vecino más próximo) altas (p.ej., 82⁰C) y parecidas (+5⁰C). Sus composiciones de bases deben ser similares y equilibradas para GC/AT (idealmente del 50%) y no contener horno polímeros o secuencias repetidas ¹⁰⁰.

Para que el cebador sea eficiente, es conveniente evitar que tenga tramos auto-complementarios extensos para no permitir la formación de estructura secundaria. Además, en la reacción de PCR es preciso que los dos *primers* no sean complementarios entre sí para evitar la formación de dímeros. Y, por supuesto, debe ser específico y no unirse con demasiada afinidad a ninguna otra región de la secuencia ¹⁰⁵.

8.2 Características del primer o cebador

Para que el *primer* sea útil debe poseer las siguientes propiedades:

- Debe ser específico de la región que queremos replicar
- Debe unirse con suficiente energía para soportar las condiciones del experimento
- No debe permitir la formación de estructuras que dificulten la reacción ¹⁰⁵.
- No utilizar *primers* con largas corridas de una base simple (más de tres o cuatro, especialmente G o C).
- Los *primers* deben ser, en lo posible, de al menos 18 bases de longitud para asegurar una buena hibridación.
- Los *primers* con temperatura de *annealing* por encima de 45°C generalmente producen mejores resultados que los *primers* con temperaturas de *annealing* más bajas.
- Para *primers* que tienen un contenido de GC menor del 50%, puede ser necesario extender las secuencias a más de 18 bases, para mantener la temperatura de *annealing* por encima del límite inferior de 45°C.
- El uso de *primers* de más de 18 bases de longitud minimiza las oportunidades de encontrar problemas debido a un sitio de hibridación secundario en el inserto o en el vector.
- Los *primers* que tienen estructura secundaria o que pueden hibridar para formar dímeros deben ser evitados ¹¹⁴.

Los *primers* de oligonucleótidos son en general sintetizados en el rango de 18-30 bases. El rendimiento del DNA sintetizado usando precursores de alta calidad son también generalmente altos y no se requiere de una nueva purificación después de eluir la columna. Pueden ser almacenados en amoníaco, el cual es líquido a 20°C, permitiendo la dispersión de *primers* sin repetir el congelado-descongelado.

Si la degradación o la síntesis incompleta de los primers se sospecha, puede ser comprobado por marcado final y análisis sobre un 20% de desnaturalización del gel. Los resultados podrían mostrar una banda predominante con un rastro menor de bandas. Si los *primers* altamente purificados son necesarios, un gel de poliacrilamida al 20% no desnaturalizado puede ser usado para aislar la principal banda. Las secuencias de *primers* podrían tener un contenido similar de G+C, estructura secundaria mínima y baja complementariedad del uno al otro, particularmente en la región 3'. Se ha encontrado que *primers* grandes, de 24-30 bases trabajan bien en temperatura de *annealing* por encima de 60°C ⁵¹.

8.3 Cálculo de la temperatura de hibridación (*annealing*)

La temperatura de *annealing* (T_a) es la temperatura a la cual la mitad de los *primers* son alineados a su secuencia blanco y caracteriza la estabilidad del híbrido de DNA formado entre un *primer* y su cadena complementaria. Su conocimiento es crítico para determinar la temperatura óptima a la cual usar un oligonucleótido como *primer* en aplicaciones tipo PCR o secuenciación ¹¹⁴.

En ausencia de agentes estabilizantes, como formamida o urea, la temperatura de *annealing* (T_a) depende de tres parámetros principales:

1. La secuencia: una secuencia rica en GC tiene una temperatura de *annealing* mayor.
2. La concentración del *primer*: altas concentraciones de *primer* favorecen la formación de híbridos lo cual resulta de una mayor temperatura de *annealing*.
3. La concentración de sales: una alta fuerza iónica resulta en una mayor temperatura de *annealing* ya que los cationes estabilizan los duplex de DNA.

Otros factores como la longitud del *primer* y las condiciones de hibridación son también importantes ¹¹⁴.

Las ecuaciones para el cálculo de la temperatura de *annealing* son las siguientes:

1.- Esta temperatura puede ser aproximadamente calculada por el número de bases nitrogenadas que contenga el *primer*, por la ecuación de Wallace:

$$T_a = 4(G+C) + 2(A+T)$$

Donde A, T, G y C son las bases nitrogenadas del nucleótido ⁵¹.

Que se calcula en función del contenido de bases en el *primer*. Esta ecuación fue desarrollada para *primers* cortos (14-20 bases) que hibriden con DNA inmovilizado en la membrana, en NaCl 0.9M ¹¹³.

3.- Otra ecuación general para el cálculo de la temperatura de *annealing*, la cual es válida para *primers* más largos, de más de 50 nucleótidos (pH 5-9) es:

$$T_a = 81.5 + 16.6 \log M + 41(XG+XC) - 500/L - 0.62F$$

Donde M es la concentración molar de cationes monovalentes, XG y XC son las fracciones molares de G y C en el *primer*, L es la longitud de la cadena más corta que existe como cadena doble y F es la concentración molar de formamida. Esta ecuación es muy útil ya que considera dos de los factores que más influyen en la temperatura de *annealing*. Es decir que la mejor ecuación en una situación particular dependerá del tipo de experimento que se quiera realizar. Independientemente de la forma en que se haya calculado la temperatura de *annealing* los resultados deben ser usados con precaución. Muchos experimentos involucran reactivos o condiciones que invaliden los resultados de las ecuaciones anteriores ¹¹³. Para una buena selección de *primers*, varios *primers* deben ser inicialmente probados y finalmente dos de ellos serán seleccionados en base al número, intensidad y distribución de bandas claramente distinguibles entre las especies ^{42, 76}.

9. TÉCNICA DE ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR

9.1 Electroforesis

Se define como electroforesis, a aquel proceso en el cual, las especies cargadas (iones o partículas coloides) se separan, en función de su distinta velocidad de migración, cuando se encuentran sometidas a la acción de un campo eléctrico. La velocidad con que las diferentes sustancias se desplazan durante el transcurso de la electroforesis, se denomina velocidad de migración. Dicha magnitud, depende básicamente de la densidad de carga y ésta a su vez esta condicionada por una serie de parámetros (pH, fuerza iónica, diferencia de potencial del campo eléctrico aplicado, naturaleza de la muestra, interacciones de la misma con el soporte elegido, etc.) que van a acondicionar el desarrollo experimental de la técnica electroforética ²⁸.

La electroforesis es una herramienta práctica para el análisis de mezclas de compuestos biológicos, ya que permite separar macromoléculas en una mezcla, sirviendo tanto como método analítico, como preparativo para la posterior realización de otras técnicas analíticas ¹⁴.

Para que esta separación tenga lugar, es necesario que la sustancia se encuentre cargada, de manera que al colocarla en el seno de un campo eléctrico se desplace hacia un polo u otro en función de su carga. De forma general, las sustancias cargadas positivamente se dirigirán hacia el polo negativo (cátodo) y las cargadas negativamente hacia el polo positivo (ánodo).

Es necesario que todos los componentes de la mezcla a separar se encuentren cargados de igual forma (todos positivos, o todos negativos) de manera que al hacer la siembra (depósito de la muestra sobre el soporte) en uno de los polos, se dirijan todas hacia el polo contrario, separándose unos de otros en función de la distinta velocidad de migración ⁴⁵.

El desplazamiento de los distintos componentes de la muestra durante el transcurso de la electroforesis depende básicamente de:

- La carga de la sustancia.
- El voltaje del campo creado.
- El coeficiente de fricción entre el soporte y la sustancia depositada en el mismo (se opone al movimiento).

La velocidad de migración por unidad de tiempo de los distintos componentes de la muestra que queremos separar, durante el desarrollo electroforético, recibe el nombre de movilidad electroforética (μ)¹⁴.

El gel de azarosa se puede preparar de diferentes formas y una de ellas se muestra en la siguiente figura.

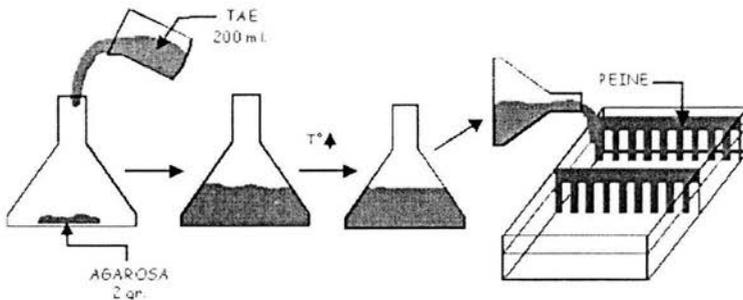


Figura 10. Preparación de gel de agarosa

9.1.1 Factores que intervienen en el desarrollo electroforético

Los principales parámetros que afectan en el desarrollo de una electroforesis y que condicionan su utilidad en el laboratorio, son básicamente: ^{24, 117}

- La carga neta de la sustancia de migración.
- La fuerza iónica del medio.

- La estructura y el tamaño de la sustancia.
- El potencial del campo eléctrico aplicado durante el proceso.
- La intensidad y características generales de la corriente eléctrica aplicada.
- El soporte utilizado.
- El revelado.

9.1.2 Características generales de la corriente aplicada

El voltaje aplicado durante la electroforesis influye de forma decisiva en el resultado obtenido. En general, cuanto mayor es el voltaje aplicado, mejor es la resolución obtenida. No obstante, el calor generado durante el desarrollo electroforético, provoca la evaporación de parte del agua contenida en el soporte y puede deteriorar la muestra. Los voltajes a los que habrá que trabajar en una electroforesis, estarán limitados por el exceso de calentamiento que puede tener lugar. En el caso de una electroforesis convencional sobre gel de agarosa, esto no representa ningún problema, dada la breve duración del proceso (unos 20 minutos) y el moderado voltaje. En cambio, los sistemas que utilizan voltajes elevados deben estar provistos de dispositivos de refrigeración, capaces de mantener constantes la temperatura durante todo el proceso ².

9.1.3 Revelado

Para el revelado de las bandas, correspondientes a cada una de las fracciones obtenidas de la técnica de PCR, puede recurrirse a diversos procedimientos, en función de la sustancia y de la sensibilidad requerida en cada momento. En el caso de la electroforesis de proteínas o ácidos nucleicos, la sensibilidad mejora considerablemente, con los colorantes químicos (azul de bromofenol, negro amido o bromuro de etidio) teniendo gran sensibilidad. El bromuro de etidio es una sustancia fluorescente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del DNA, posibilitando su visualización cuando se ilumina con luz ultravioleta. Cuando

los fragmentos esperados son de un tamaño muy pequeño se pueden emplear también geles de poliacrilamida ³⁰. Una fotografía por electroforesis se vería de la siguiente manera.

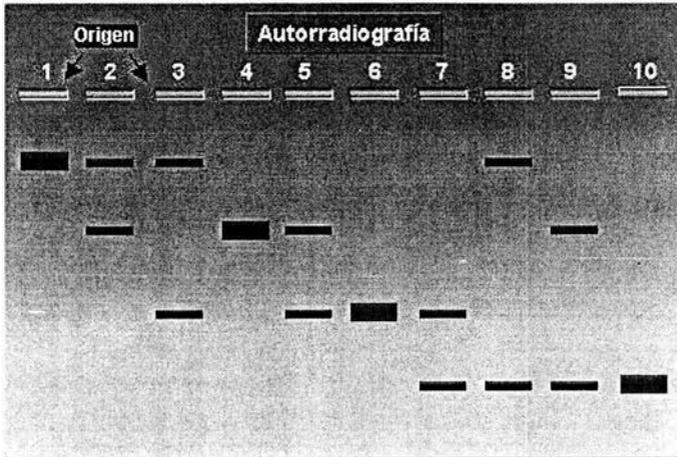


Figura 11 . Esquema de una radiografía por electroforesis.

10. TÉCNICAS DE PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR

La técnica empleada para purificar fragmentos de PCR para usar como molde en posteriores reacciones como las de secuenciación, depende mucho de la optimización realizada en el PCR. Si el PCR es rigurosamente optimizado y se usaron bajas concentraciones de *primers* y nucleótidos puede elegirse un protocolo simple de precipitación. Si los productos de PCR contienen especies contaminantes o grandes cantidades de *primers* y nucleótidos remanentes, debe optarse por otro tipo de purificaciones. Existe una gran variedad de métodos para la purificación de los productos de PCR. A continuación se detallan algunos de ellos con sus ventajas y desventajas ¹¹⁶.



Cuadro 2. Técnicas de purificación

10.1 Precipitación con Polietilenglicol cloruro de sodio (PEG/ NaCl)

Un método simple de purificación de los productos de PCR, es la precipitación con PEG. Sin embargo este método no tiene buenos rendimientos para fragmentos de PCR de menos de 250 pb. El siguiente protocolo puede servir como guía:

1. Llevar el producto de PCR a un volumen final de 100 μ L adicionando agua bidestilada.
2. Agregar 0,6 volúmenes de polietilenglicon (PEG) 6000 20%-2,5M NaCl
3. Mantener 10 minutos a 37 °C
4. Mantener 30 minutos en agua helada
5. Centrifugar 20 minutos en frío a 14.000 rpm
6. Eliminar el sobrenadante
7. Agregar 100 μ L de etanol 70%, para lavar el pellet (en general no se ve)
8. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm
9. Eliminar el sobrenadante
10. Secar el pellet
11. Resuspender en 10 μ L de agua.

Ventajas: El método es fácil de usar, de bajo costo y permite el procesamiento simultáneo de muchas muestras.

Desventajas: Si son generados múltiples fragmentos de PCR, este método no los elimina. Si el sitio de unión del primer está presente en los productos secundarios los datos de secuencia serán de baja calidad. El rendimiento suele ser una limitante. Fragmentos de 700-800 pb o superiores son purificados con una eficiencia de ~80%. Fragmentos < 400 pb tienen rendimientos de ~20%.

10.2 Purificación con exonucleasa I / SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)

Consiste de una degradación de los *primers* residuales por acción de la exonucleasa I y una defosforilación de los nucleótidos residuales por acción de la SAP. Ambas enzimas son posteriormente inactivadas por calor, y los productos de PCR pueden ser usados directamente en una reacción de secuenciación. La reacción de PCR debe ser optimizada para prevenir la formación de productos secundarios, ya que ellos no son removidos durante la purificación cuando este método es usado.

Ventajas: El método es fácil de usar, de bajo costo y permite el procesamiento simultáneo de muchas muestras.

Desventajas: Si múltiples fragmentos de PCR son generados, este método no los elimina. Si el sitio de unión del *primer* está presente en los productos secundarios los datos de secuencia serán de baja calidad.

10.3 Purificación por columnas

Muchos productos comerciales basados en la técnica por columnas están disponibles para purificar fragmentos de PCR. El QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen usa una membrana de sílica que adsorbe DNA en buffers de unión especializados. Esta técnica separa oligonucleótidos de hasta 40 bases de productos de DNA de mayor tamaño, lo cual lo convierte en un sistema útil para remover *primers* y nucleótido. El DNA es eluido en agua, Tris o TE.

Una estrategia alternativa a la adsorción de DNA es la ultrafiltración a través de membranas con un tamaño de corte específico. Las columnas CENTRICON 100 (Perkin Elmer o Amicon) tienen un tamaño de corte de 100,000 y son útiles para remover *primers* y nucleótidos de productos de PCR. Estas columnas remueven

DNA de cadena simple de menos de 300 bases y DNA de cadena doble de menos de 125 pares de bases. Los productos pueden ser recuperados en agua.

Otros productos comerciales usan medios para cromatografía de filtración en gel (por ejemplo Sephacryl de Pharmacia) para realizar separaciones similares de los productos de PCR. Estos sistemas eliminan *primers* y nucleótidos remanentes. Existen varios medios y formatos disponibles en el mercado ¹³².

Ventajas: Estos sistemas son muy rápidos y fáciles de usar y contienen reactivos y materiales de calidad controlada. La reproducibilidad tiende a ser alta.

Desventajas: Al igual que los métodos anteriores no remueve productos de PCR contaminantes, a menos que tengan un tamaño menor que el del tamaño de corte. La mayoría de los dímeros de *primers* son eliminados, pero los oligómeros de *primers* pueden no ser eliminados. Si el mismo *primer* es usado en la secuenciación, estos oligómeros pueden generar productos de extensión contaminantes. Es muy importante asegurar que la técnica de PCR sea lo suficientemente específica cuando estos sistemas son utilizados. Además es muy importante revisar la cantidad de producto recuperado. La recuperación puede ser analizada en forma sencilla en gel de agarosa.

10.4 Purificación en gel

Estos sistemas de purificación consisten en una separación por tamaño de los productos de PCR en un gel, y el posterior aislamiento de los productos de interés desde el gel. Este aislamiento puede ser alcanzado por una variedad de métodos comerciales.

Ventajas: La principal ventaja de este tipo de purificación radica en que aísla específicamente el producto de interés. De manera tal que si el PCR no ha sido eficientemente optimizada, los productos inespecíficos no son arrastrados.

Desventajas: Algunas de las desventajas son la variabilidad en el porcentaje de recuperación con cada purificación y el tiempo que lleva el aislamiento. Además la exposición a la luz UV usada para visualizar los productos con Biuret en el gel puede dañar el molde de PCR produciendo falsos positivos ¹¹⁶.

11. TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS QUE APOYAN EL ANÁLISIS DE PCR PARA LA AUTENTIFICACIÓN DE ESPECIES

En ocasiones la utilización de la PCR no es por si sola suficiente para la autentificación, sobre todo de especies filogenéticamente similares o incluso para estudios de variedades distintas de la especie, por lo que se requiere de la utilización de técnica complementarias que permitan lograr estos objetivos ^{1, 10, 71, 95}.

Como se mencionó anteriormente, los métodos disponibles para el análisis de los productos amplificados por PCR, dependen directamente del diseño de la reacción y de los *primers* utilizados. Y en algunos casos será requerida más de una técnica secundaria para establecer la especie inequívocamente.

Por ejemplo en técnicas cuyo DNA diana se localiza en múltiples genes simultáneamente para producir un patrón parecido a una huella digital, se utilizan los análisis RAPDs y, segundo, las técnicas cuyo DNA diana es simple a tiene muy pocas locaciones en genes, se utilizan los análisis de RFLP o SSCP. La ventaja que distingue a las últimas técnicas no sólo es su habilidad para identificar especies provenientes de procesos duros y aún de muestras degradadas, sino también su habilidad para identificar fácilmente diversas especies dentro de un mismo producto. Las técnicas presentadas se mencionan a continuación.

11.1 Secuenciación

La mayoría de los métodos directos que obtuvieron información de los productos de PCR son por secuenciación. De este modo la información obtenida ha sido usada para la identificación del origen de varias especies. En tales trabajos se cuida la concentración o la amplificación de la secuencia del mtDNA que generalmente es del gen del citocromo b. Después de la secuenciación se usan determinadas relaciones filogenéticas en bancos genéticos ⁴¹.

Este método de identificación de especies consiste en la amplificación de un determinado fragmento génico por PCR y su posterior secuenciación.

Para el desarrollo de la secuenciación se puede hacer por medio de dos métodos, de manera manual por el método de Federico Sanger y otro por el método automático desarrollado por Alan Maxam y Walter Gilbert. Estas técnicas se basan en métodos electroforéticos que permiten la separación de hebras de DNA cuyo tamaño difiere en un solo nucleótido. Frecuentemente se utiliza poliacrilamida como matriz de los geles en el análisis de DNA cortos y para los fragmentos más largos se utiliza gel de agarosa ⁵⁹.

Tanto el método de Sanger como el de Maxam y Gilbert, el principio general consiste en la reducción del DNA que se quiere secuenciar a cuatro grupos de fragmentos marcados. La reacción que da lugar a cada uno de los grupos es específica de base, de manera que las longitudes de los fragmentos corresponden a posiciones de la secuencia del DNA donde se halla una determinada base ⁵⁹.

11.1.1 Método manual por el método de Sanger

Este método utiliza el mecanismo de síntesis de DNA por las DNA polimerasas.

- a) Las DNA polimerasas requieren un cebador (oligonucleótido corto o primer) al que se añaden los nucleótidos y una hebra molde que dirige la selección de cada uno de los nuevos nucleótidos que han de incorporarse a la secuencia. El grupo hidroxilo en 3' del cebador reacciona con desoxinucleósido trifosfato entrante (dNTP), formando un nuevo enlace fosfodiéster. El procedimiento de secuenciación de Sanger utiliza análogos del tipo dideoxinucleósido trifosfato (ddNTP)
- b) para interrumpir la síntesis del DNA. (El método de Sanger también es conocido como el método de los didesoxi). Cuando el dNTP es reemplazado

por el ddNTP se detiene la elongación de la cadena a causa de la ausencia del grupo hidroxilo en 3' necesario para la siguiente reacción.

- c) El DNA a secuenciar se utiliza como hebra molde y se hibrida con un cebador corto, marcado con radioactividad o con fluorescencia. Mediante la adición de pequeñas cantidades de un único ddNTP, por ejemplo ddCTP, las hebras sintetizadas detendrán su crecimiento en las posiciones en las que normalmente se secuencia dC. A consecuencia de la mayor cantidad de dCTP con relación a ddCTP, la probabilidad de que se incorpore el análogo en los casos en que deba incorporarse dC es pequeña. Sin embargo, la cantidad de ddCTP es suficientemente grande para asegurar que cada nueva hebra sintetizada incorpore al menos un ddCTP en algún punto durante la síntesis. El resultado es una disolución que contiene una mezcla de fragmentos marcados acabados en un residuo C. Cada residuo C genera un conjunto de fragmentos de una longitud determinada, de forma que el tamaño de los fragmentos, separados por electroforesis, indica la localización de los residuos C con la secuencia. Este procedimiento se repite separadamente para cada uno de los cuatro ddNTP, y la secuencia puede leerse directamente en una autorradiografía del gel. Los fragmentos de DNA más cortos migran a mayor velocidad, de manera que los más cercanos al extremo inferior del gel representan las posiciones de nucleótidos más cercanas al cebador (extremo 5') y la secuencia se lee de abajo hacia arriba ⁵⁹.

Estos pasos se pueden esquematizar de la siguiente manera.

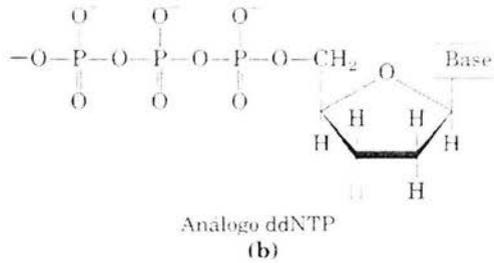
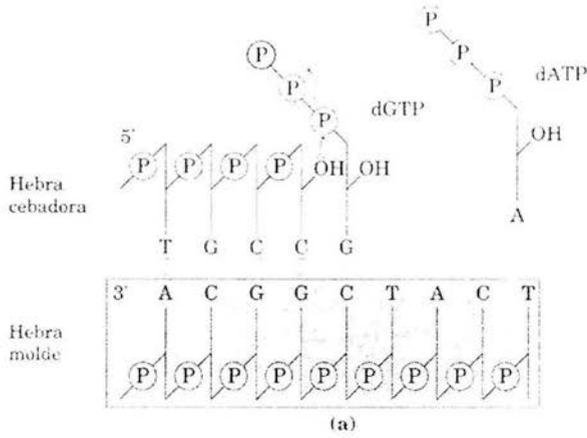


Figura 12. a) Unión del *Primer* a la cadena molde b) Molécula ddNTP que detiene la elongación.

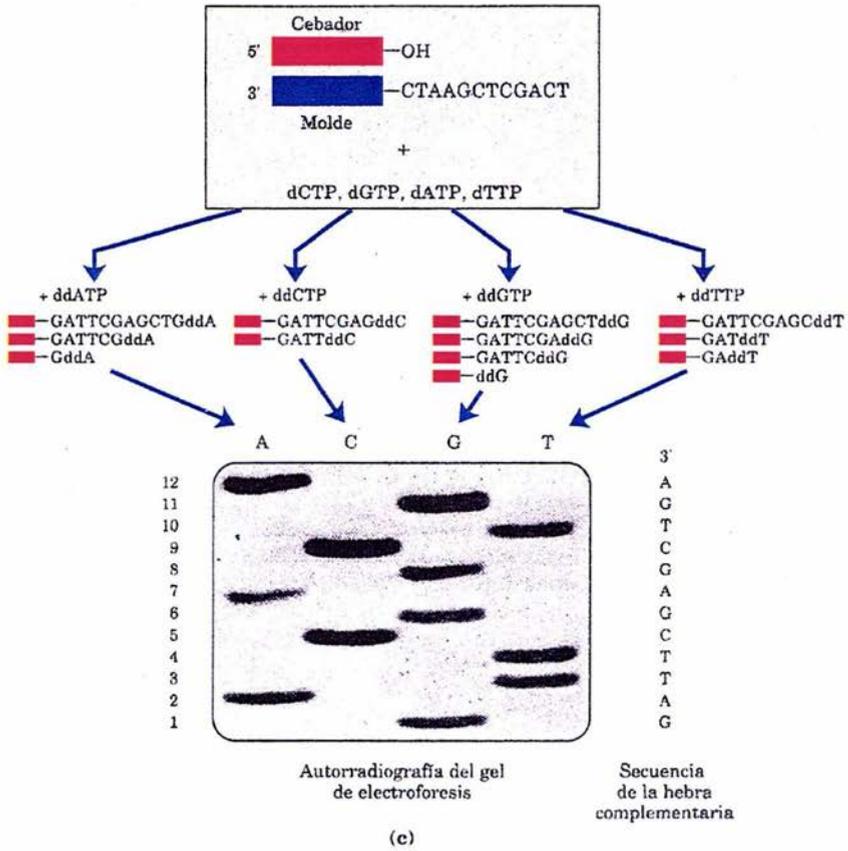


Figura 13. Secuenciación manual por el método de Sanger⁵⁹

(PCR)

11.1.2 Método automático de Maxam y Gilbert

Los oligonucleótidos cortos usados como cebadores para la síntesis de DNA en el método de Sanger pueden unirse a una molécula fluorescente que confiere a todo los fragmentos terminados en este nucleótido un color determinado. Los cuatro ddNTP se añaden a un único tubo. Los fragmentos de DNA coloreado resultantes se separan a continuación por tamaño mediante electroforesis en un único gel contenido en un tubo capilar (una modalidad electroforética que permite separaciones más rápidas). Todos los fragmentos de una longitud determinada migran a través del gel en un solo pico y el color asociado a cada uno de ellos se detecta utilizando un rayo láser. La secuencia del DNA se lee determinando la secuencia de los colores de los picos según van pasando por el detector y la información obtenida se envía directamente a un ordenador que determina la secuencia, como lo muestra la siguiente figura⁵⁹.

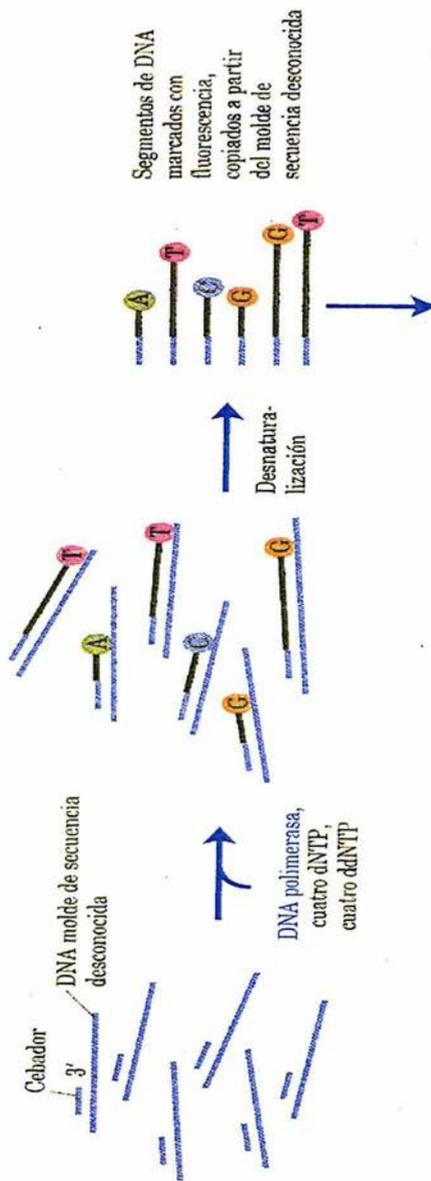


Figura 14. Componentes de la reacción de Sanger

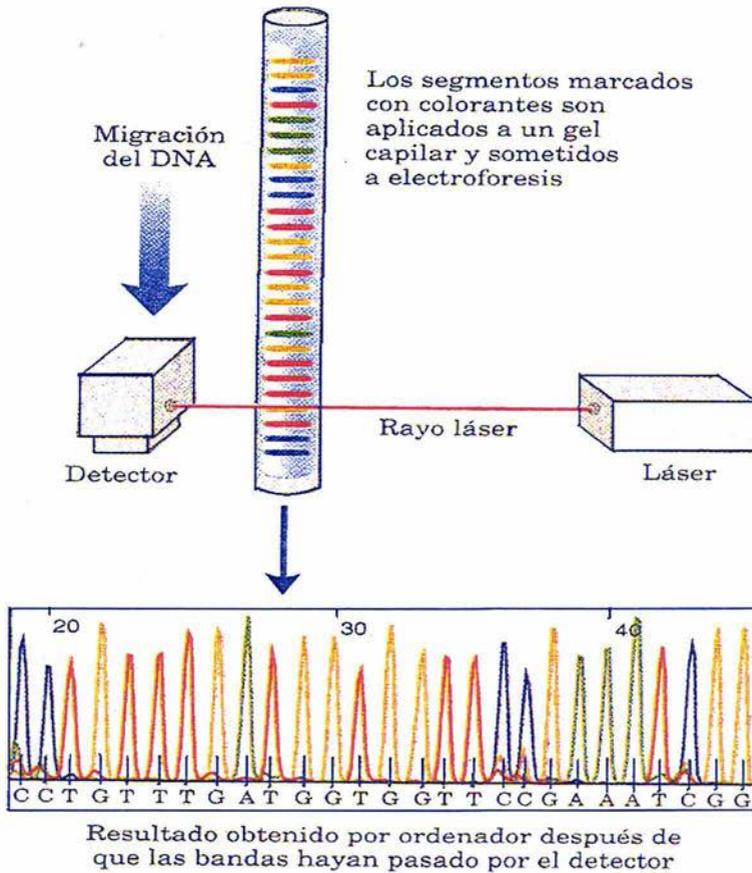


Figura 15. Secuenciación automática por el método de Maxam y Gilbert

Una de las partes más importantes en el desarrollo de la identificación basada en la secuenciación es la selección de la secuencia patrón. Este debe contener bastante información que permita la diferenciación de todas las especies de pescado bajo estudio y que tenga una baja variabilidad intraespecífica. La longitud del segmento secuenciado también juega un papel importante, puesto que determinará la aplicación del método en cuanto al tamaño del fragmento del cebador a emplear ⁶⁷.

Una vez que la secuencia desconocida es obtenida, el método común para la identificación de especies se hace calculando la distancia genética entre la secuencia desconocida y un grupo de secuencias de referencia. Las distancias genéticas pueden después ser usadas para construir una matriz de distancia donde la secuencia no conocida mostrará la distancia más baja con el grupo filogenético al cual corresponde ⁶.

Ventajas

- El usar la técnica de secuenciación tiene varias ventajas, con respecto a otros métodos, por ejemplo, permite la clasificación de una muestra no conocida en el grupo de especies al cual pertenece ⁸¹.
- Permite la detección de nuevas especies que se encuentran en el mercado o incluso de especies poco comunes que están siendo vendidas bajo etiquetados falsos.
- Es también posible superar problemas asociados con la existencia de variabilidad intraespecífica, desde la secuencia usada para la identificación.
- La reacción de secuenciación puede realizarse mediante una modificación de la reacción de PCR en la que se usa un único oligo ⁹⁸.
- La secuenciación directa de los productos de PCR permite la generación de datos secuenciados de DNA directamente de patentes y muestras del ambiente o de regiones genómicas que son difíciles de clonar ⁵⁵.

La secuenciación de fragmentos de DNA amplificados por PCR es, no obstante, una herramienta analítica, laboriosa y que requiere personal especializado. No resulta por tanto adecuada para la identificación de especies en laboratorio de análisis de alimentos y control de calidad, en los que se requiere una técnica sencilla, rápida y barata con la que llevar a cabo el análisis rutinario de un gran número de muestras ¹³.

11.2 Análisis de Polimorfismos en Fragmentos de Restricción (RFLP)

El primer ejemplo de la técnica de Análisis Polimorfismos de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism) fue descrito en 1976 por Kan y otros colaboradores. Fue posible gracias al uso de herramientas auxiliares de Biología Molecular previamente descritas. Así, en 1970 se había identificado la primera enzima de restricción específica, que podía cortar largas cadenas de ácidos nucleicos en fragmentos discretos menores. También se había demostrado que la electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida podía usarse para separar dichos fragmento por tamaños. Todo ello era complementado con la transferencia de ácidos nucleicos a membranas y su posterior detección (1975) ¹¹⁰.

El análisis por medio de RFLP de los productos de PCR constituye una alternativa más sencilla para la identificación de especies ^{12, 15, 18, 46, 74, 79, 92}.

Esta técnica se fundamenta en un corte aleatorio con una o varias enzimas de restricción de una muestra de DNA que puede ser todo el genoma de una especie o un producto de PCR. En la cual se obtiene una huella digital (*fingerprinting*) para cada especie que son debidos a un corte aleatorio dependiendo de la enzima de restricción analizada ^{2, 19}.

El método usa la secuencia de DNA amplificada por PCR, la cual es tratada posteriormente con enzimas de restricción las cuales reconocen una cadena de DNA muy corta dentro del fragmento amplificado. Normalmente las enzimas de restricción

son de 4 a 6 nucleótidos, lo cual significa que deben reconocer una secuencia de 4-6 nucleótidos y cortar en diferentes puntos. Los fragmentos de restricción son separados por electroforesis.^{67, 68, 12, 74}

El método de RFLP permite diferenciar distintos organismos mediante el análisis de patrones de bandas, derivados de la ruptura de sus respectivos DNAs. Estos patrones conocidos como perfiles de restricción de DNA, se originan gracias a la actividad de unas enzimas, las endonucleasas de restricción. Las endonucleasas son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster de la molécula de DNA en determinadas secuencias nucleotídicas, específicas para cada enzima, denominadas dianas de restricción. Los reconocimientos de estas enzimas suelen ser secuencias cortas de unas 4-6 pb. Las endonucleasas de restricción se denominan con tres o cuatro letras que proceden del nombre de la bacterias en la que se han aislado, y además se les añade un número romano (ejemplo ECO 01091).

En los distintos individuos hay variación en los lugares del DNA en los que se encuentran las dianas de restricción originándose por tanto fragmentos de distinta longitud^{13, 66}.

En la siguiente figura se muestra un protocolo típico de RFLP. En primer lugar se aísla el DNA genómico del material biológico a estudiar. Es importante que dicho DNA tenga un elevado grado de pureza y particularmente esté libre de polisacáridos y otros inhibidores de las enzimas de restricción. El paso siguiente es precisamente la digestión de dicho DNA mediante restrictasas. Los fragmentos discretos generados se someten a electroforesis en gel de agarosa, para ser de esta forma segregados por tamaños.

RFLP

Análisis de los Polimorfismos en los Fragmentos de Restricción

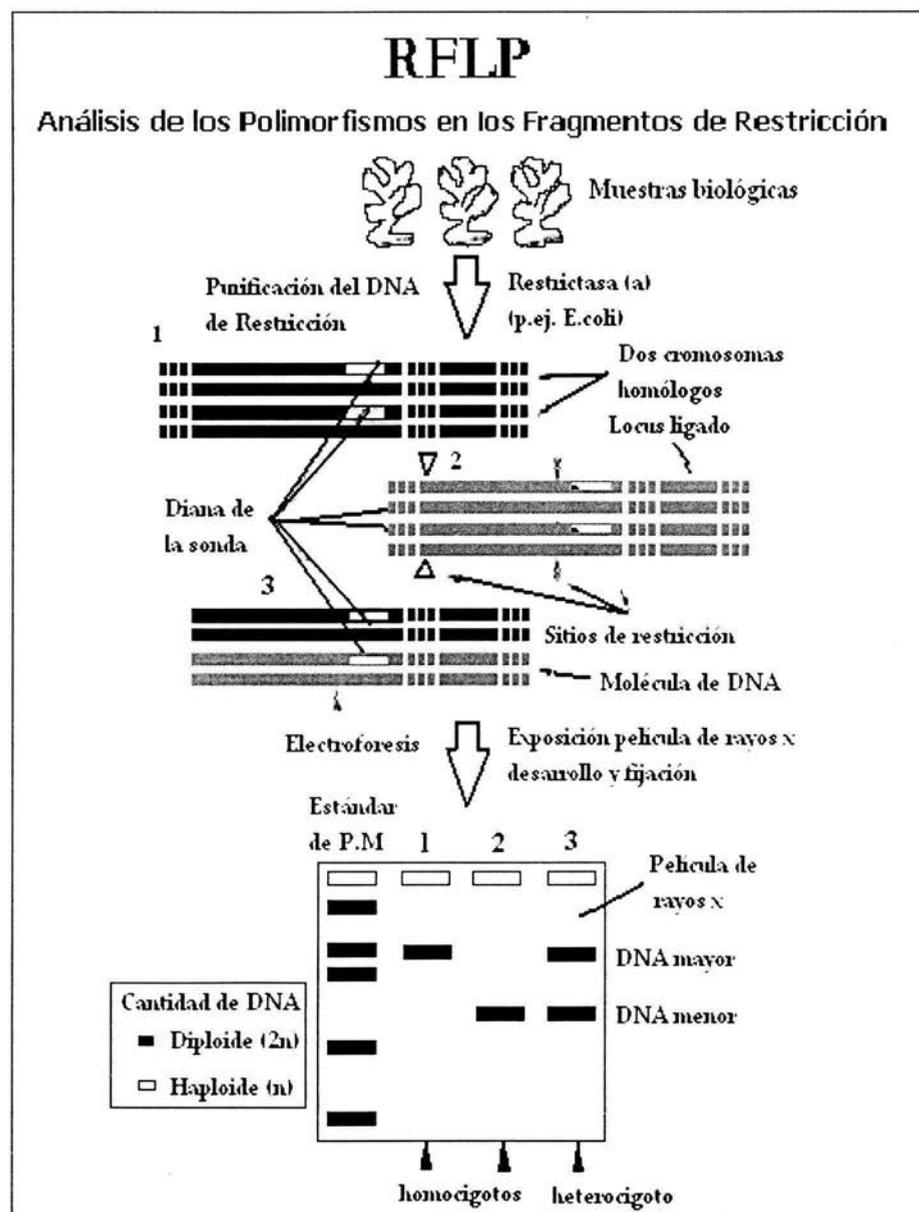


FIGURA 16. Análisis de Polimorfismos en fragmentos de Restricción (RFLP).

El ADN purificado a partir del material biológico es digerido mediante una o varias enzimas de restricción. El producto de la reacción se somete a electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN de interés son detectados mediante "Southern blotting", usando una sonda marcada. A la izquierda del gel se representa un estándar de pesos moleculares.

La prueba de RFLP muestra por lo tanto, su capacidad para diferenciar muestras que por la utilización de *primers* específicos no han podido ser diferenciadas, pero sobre todo, su potencial para detectar contaminación por especies extrañas que, para la industria alimentaria, es de vital importancia.

Ventajas

- La técnica es muy simple.
- Relativamente barata (dependiendo de la enzima empleada).
- Requiere la amplificación de un fragmento en particular de DNA ^{6,74}.

Desventajas

- No garantiza que las especies producirán un patrón específico de RFLP, esto significa que deberían dar exactamente el mismo patrón de las otras especies estudiadas. Idealmente, el rango de la secuencia de las especies usadas para cubrir el rango de especies potenciales las cuales pueden ser usadas en un producto en particular ⁶.

11.3 Análisis del Polimorfismo del DNA amplificado con Cebadores Arbitrarios (RAPD).

Después de la separación electroforética en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de los producto de PCR. Se puede utilizar la técnica de Análisis amplificado con cebadores arbitrarios (*Random Amplified Polymorphic DNA*) en la identificación en todo tipo de especies. Esta técnica fue descrita de forma independiente y simultánea en 1990 por Welsh, Williams y otros.

La técnica de RAPD constituye un PCR modificado especial. Esto es así porque el PCR clásico (descrito anteriormente), requiere el conocimiento de las secuencias de el DNA a amplificar para el diseño de los correspondientes *primers*. Sin embargo, en muchos casos no se dispone de dicha información. En tales circunstancias, es todavía posible realizar una amplificación "al azar", siempre que se utilicen *primers* pequeños (generalmente, de 10 bases) y a temperaturas de hibridación muy permisivas (p.ej., 35-42°C) ¹¹⁰.

En la técnica de RAPD es importante que el DNA esté libre de compuestos polifenólicos (taninos y otros), que lo podrían oxidar. Generalmente se recomienda polimerizar mediante el fragmento "Stoffel" de la polimerasa AmpliTaq de Applied Biosystems, ya que produce RAPDs más consistentes y repetitivos ¹¹⁰.

Este método se basa en una amplificación aleatoria de DNA, dando como resultado unos fragmentos distintos a un PCR ya que utiliza *primers* no específicos a una temperatura de hibridación muy inespecíficas. Consiste en reducir la temperatura de hibridación durante el PCR y usar un *primer* no específico de cadena muy corta, con la que se va a poder unir a cualquier zona del genoma, originando un gran número de fragmentos, dando un perfil de bandas muy característico que nos da mucha información sobre el producto

que se trata. Se generan perfiles electroforéticos distintos entre productos diferentes dentro de cada especie (se origina una huella dactilar). Al utilizar una temperatura de hibridación muy inespecífica los *primers* se van uniendo con una relativa variedad de errores, estando posicionados a una distancia de unos cientos de bases de otros, por lo que da lugar a muy diferentes fragmentos. Cuanto menor es el tamaño de los *primers*, menor es el número de los fragmentos obtenidos y en mayor cantidad, pues es más fácil que esos cebadores encuentre una secuencia diana en todo el genoma. Al contrario ocurre cuando los cebadores son de mayor tamaño, pues aún permitiendo un cierto margen de error, es más difícil encontrar tantas bases complementarias al *primer* para su hibridación ².

Esta metodología permite la amplificación en condiciones permisivas de secuencias discretas de DNA genómico. El carril izquierdo del gel muestra patrones de peso molecular

Los *primers* (uno o varios tipos moleculares diferentes) se unen a distintas secuencias diana y comienzan a generarse amplificaciones de diferentes tamaños. Los *primers* arbitrarios no son de más de 7-10 pb de longitud, además no está dirigido a una sola secuencia conocida sino el *primer* es diseñado arbitrariamente. Esto significa que la amplificación de los segmentos aleatorios del DNA son dirigidos por un *primer* sencillo de secuencia arbitraria (AP-PCR). Así, es generada una característica del espectro de los productos de DNA corto de varios complejos. Manifestaciones polimórficas por la longitud de secuencias amplificadas obtenidas comúnmente conocidas como RAPD, la cual puede ser usada para comparar diferentes especies ^{26, 34, 37, 47, 72, 58, 85}. Esta metodología se puede observar en la figura 17.

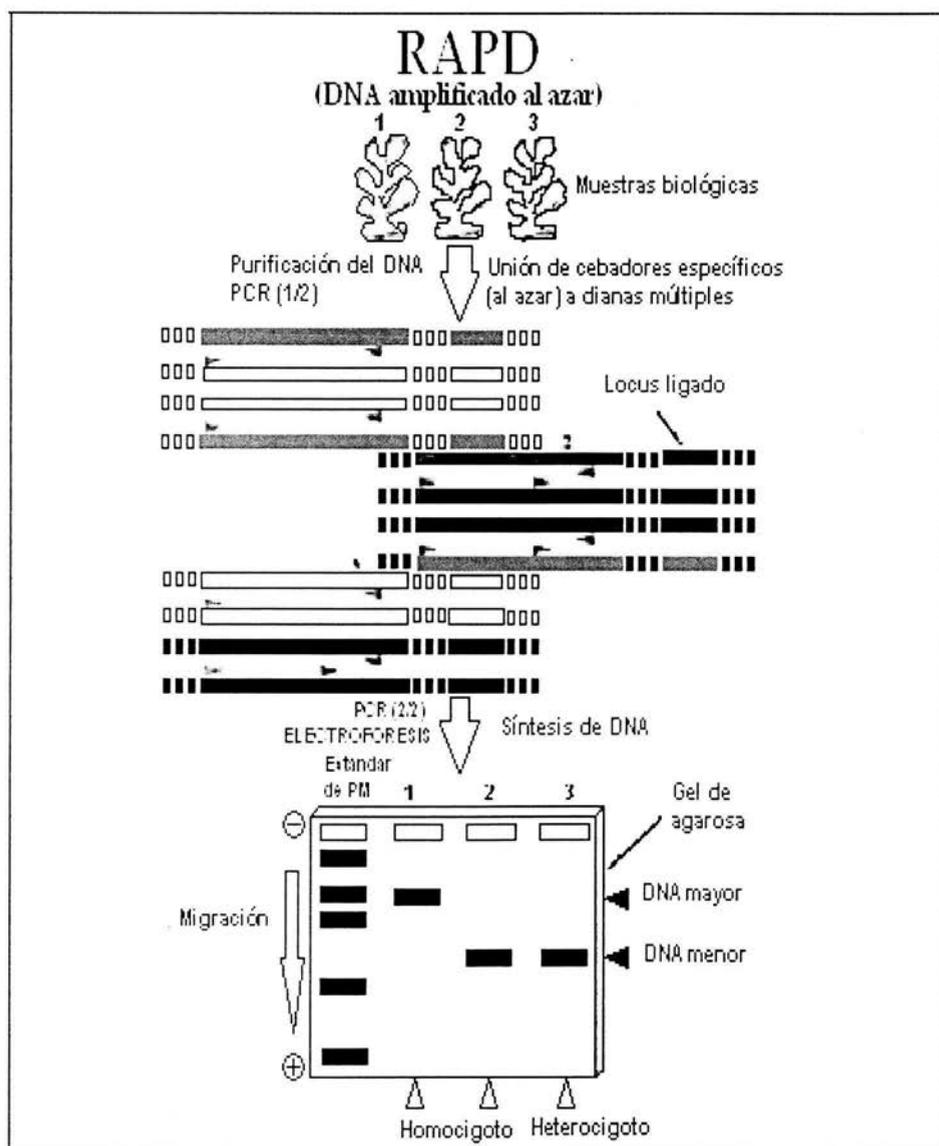


FIGURA 17. Análisis del Polimorfismo del DNA Amplificado con Cebadores Arbitrarios (RAPD).

Esta metodología permite la amplificación en condiciones permisivas de secuencias discretas de DNA genómico. El carril izquierdo del gel muestra patrones de peso molecular

Los *primers* (uno o varios tipos moleculares diferentes) se unen a distintas secuencias diana y comienzan a generarse amplificaciones de diferentes tamaños. Los *primers* arbitrarios no son de más de 7-10 pb de longitud, además no está dirigido a una sola secuencia conocida sino el *primer* es diseñado arbitrariamente. Esto significa que la amplificación de los segmentos aleatorios del DNA son dirigidos por un *primer* sencillo de secuencia arbitraria (AP-PCR). Así, es generada una característica del espectro de los productos de DNA corto de varios complejos. Manifestaciones polimórficas por la longitud de secuencias amplificadas obtenidas comúnmente conocidas como RAPD, la cual puede ser usada para comparar diferentes especies^{26, 34, 37, 47, 72, 58, 85}. Esto es muy importante, porque va a condicionar el hecho de que los RAPDs presenten generalmente un patrón de segregación genético dominante; es decir, que no permitan diferenciar al heterocigoto de uno de los homocigotos. La razón de dicha segregación de tipo dominante es la posible mayor longitud de una amplificación en relación al competidor. Y sobre todo la diferente afinidad de cada oligo por sus dianas. Ello producirá diferentes reacciones en desigualdad de condiciones, entre los diferentes productos amplificados. Debe recordarse que la hibridación del oligo con la diana no suele ser perfecta; después de todo, son oligos inespecíficos. De modo que, no todos los posibles amplicones serán reamplificados con la misma eficiencia. Tendrán preferencia los más cortos, y sobre todo (dentro de un rango de tamaños no muy grande), aquellos en que los *primers* delimitantes tengan mayor afinidad por su diana

Reacción

Después de haber obtenido el DNA purificado de la muestra, se usan 100 ng de ésta en un medio conteniendo 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 100 μ M de cada dNTP, 2.5 U de Taq polimerasa y 2.6 μ M de un *primer* en un volumen de reacción de 50 μ L. la temperatura estándar de los análisis de RAPD son (90°C por 1 min y 95°C por 90 segundos) seguido de 45 ciclos a 95°C por 30 segundos, 38-42°C por 1 minuto y 75°C por 2 minutos en un termociclador. La mezcla de la reacción es después incubada a 75°C por 10 minutos y a 60°C por 10 minutos. Los productos amplificados son después analizados en gel de agarosa al 1.5% ⁸.

En definitiva, las principales características de los RAPDs pueden resumirse como sigue ¹¹⁰:

- No requiere conocimiento previo de la secuencia.
- Es una técnica basada en PCR.
- Tiene requerimientos relativamente bajos de mano de obra y costo.
- Es una técnica rápida.
- Genera una cantidad alta de información.
- Presenta una genética de segregación dominante (generalmente).

Se usa mucho por su simplicidad técnica ¹¹⁰.

Ventajas

- Este tipo de ensayos puede promover convergencia metodológica y de fácil entrenamiento en los laboratorios, donde los trabajos de diagnóstico son complicados por las diferentes aproximaciones analíticas y que se necesitan para convenir con varias especies patógenas. Los costos de inversión para equipo, tales como múltiples termocicladores, aparatos electroforéticos y la compra de reactivos

costosos o kits comerciales son económicamente inconvenientes cuando son intensamente y minuciosamente usados.

- Existe la posibilidad de ensayos genéticos compactados realizando duplex o múltiples PCRs, en el cual diferentes pares de *primers* son mezclados al mismo tiempo llevando a cabo amplificaciones simultáneas de los fragmentos de diagnóstico de las diferentes especies. Esto puede, en parte, compensar los excesos de trabajo que requiere para la inclusión de controles negativos en cada amplificación, y los análisis por separado de muestras duplicadas aleatorias y sistemáticamente en el orden de plantillas controladas o contaminación de las plantillas causando falsos positivos.
- La simplificación metodológica de los diagnósticos de PCR especialmente si es apoyado por la disponibilidad de kits de reactantes comerciales, pueden estimular la cultura pesquera para adoptar el método sobre el control del estado sanitario *in situ* de su cultivar. Esto podría desde luego beneficiar la eficacia de la vigilancia por autoridades oficiales, permitiendo cultivares que prevean solicitudes para la intervención y rechacen el comercio de pescado contaminados ²⁰.

Desventajas

El principal problema que presenta la técnica de RAPD es su débil reproducibilidad entre diferentes laboratorios. Esta baja reproducibilidad es inherente a la técnica, dado que su fundamento se basa precisamente en la baja especificidad de la hibridación, lo que es la causa de la aparición de bandas poco reproducibles. El problema se puede minimizar en los experimentos realizados en un mismo laboratorio, trabajando en condiciones lo más estandarizadas posibles. Sin embargo, entre diferentes laboratorios, las diferencias de reactivos, termocicladores, operación, etc., hacen difícil comparar los resultados ¹¹⁰.

11.4 Análisis del Polimorfismo en la Conformación de las Cadenas Sencillas de DNA (SSCP)

La técnica de Análisis en la Conformación de Cadenas Sencillas (SSCP) es simple, rápida y muy sensible para detectar un cambio de base o algunas diferencias en una secuencia corta de DNA (100-400 pb).

La amplificación de fragmentos cortos de DNA por PCR y análisis con SSCP usando electroforesis en gel de poliacrilamida seguida por tinción de plata de las bandas de DNA, es la que comúnmente se ha utilizado^{69, 70}.

Esta técnica se basa en la relación entre la movilidad electroforética de una hebra de DNA monocatenario (DNAMc) y su conformación, que en definitiva es un reflejo de su secuencia nucleotídica. En la técnica de SSCP, el DNA bicatenario (DNAbc) se desnaturaliza a DNAMc y posteriormente se separan las dos hebras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, bajo condiciones no desnaturalizantes. Cualquier diferencia en la secuencia del DNA va a dar lugar a un cambio en la movilidad de las moléculas de DNAMc, que se visualizará al final del proceso¹³.

Los criterios más importantes para el éxito de un SSCP son los siguientes:

- Los fragmentos de DNA deben ser menores a 300pb.
- Los geles de poliacrilamida deben ser preparados bajo un enlace cruzado en una proporción de 39:1 de acrilamida y bisacrilamida respectivamente.
- La temperatura del medio ambiente debe ser estable y mantenida durante la corrida electroforética preferiblemente a 4°C.
- Usar [³³P] dATP los cuales darán bandas más precisas durante la autorradiografía.
- Los geles deben ser corridos en una duración de tiempo suficiente para aumenta la posibilidad de cambio. Es también útil para corridas de muestras de diferentes

periodos de tiempo (ej. 3h y 4h) para minimizar el riesgo de la ausencia de cambio de banda.

- Siempre correr un DNA de doble cadena como control. Esto posibilita la identificación de fragmentos de cadena sencilla y doble, específicamente cuando las muestras han sido digeridas con enzimas de restricción y varios fragmentos son visualizados. El cambio de banda puede ser frecuentemente visto con fragmentos de cadena doble y algunas veces solamente vistos con fragmentos de doble cadena ⁵¹.

Protocolo

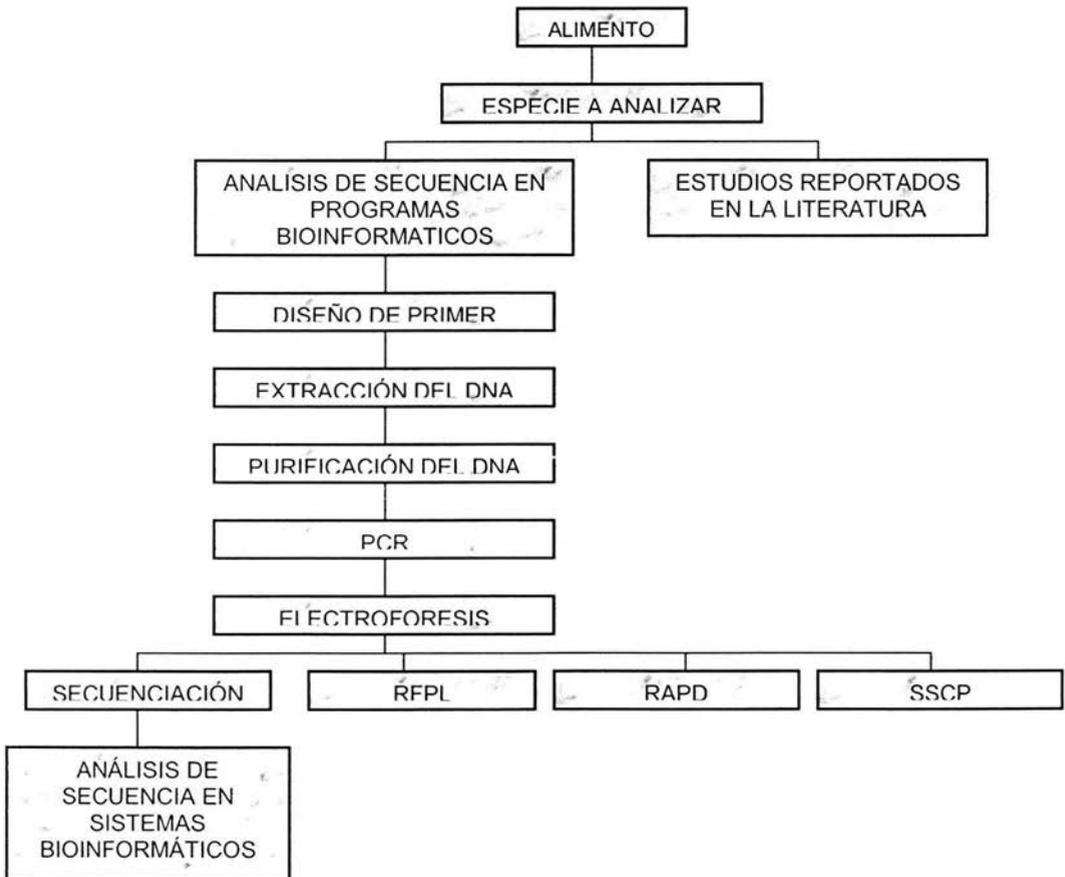
1. Amplificar los fragmentos de DNA.
2. Confirmar la amplificación, corriendo 10 μ L del producto de PCR en un gel de agarosa al 1-2%.
3. Digerir los fragmentos más grandes de 300pb con enzimas de restricción.
4. Tomar 5-10 μ L de producto de PCR etiquetado en un volumen de 25 μ L con un buffer.
5. Solamente para el DNA de cadena sencilla, desnaturalizarlo a 90-95°C por 5 min., y transferirlo inmediatamente al hielo.
6. Después de 5 min. en el hielo, transferir 3-8 μ L de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 4.5%.
7. El gel de electroforesis en 1x TBE a 4°C a 40W por 2-6hrs, dependiendo del tamaño del fragmento de DNA. En un gel de poliacrilamida al 4.5%, emigrar a una posición esperada de los fragmentos de DNA de cadena sencilla de 210nt de longitud.
8. Después de 1h, transferir un segundo lote de la misma muestra como en el paso 6 y correrlos en 2 diferentes periodos de tiempo, el riesgo de la pérdida del cambio de banda se reducirá.

9. Un carril del DNA de doble cadena debe ser corrido con cada lote de las muestras para posibilitar la distinción entre la banda de cadena sencilla y la cadena doble.
10. Transferir el gel a papel Whatman de 3mm, cubrir con una película adherible y secar bajo vacío a 80°C por 30-45min.
11. Exponer el gel a rayos X a una temperatura ambiente sin protección. Revelar la autoradiografía ⁵¹.

12. METODOLOGÍA DE EXPERIMENTACIÓN

De acuerdo a todo lo expuesto anteriormente, para realizar la técnica de PCR en la identificación y autenticación de especies es necesario tener un conocimiento previo del producto y de la especie que se desea analizar.

Para ello se realiza una investigación bibliográfica para saber si hay estudios reportados sobre esa especie y si existe disponibilidad de su secuencia genómica en sistemas bioinformáticos. A continuación se muestra la metodología a seguir para hacer un estudio de identificación por medio de la técnica de PCR.



Cuadro 3. Metodología de experimentación

13. Alimentos que pueden ser sujetos de adulteración

Es importante resaltar la utilidad de los métodos descritos anteriormente y que son aplicables para la identificación y autenticación de alimentos.

En el caso del pescado la identificación de especies es posible cuando éstas conservan intactas sus características anatómicas esenciales. Sin embargo hoy en día el pescado es procesado antes de su venta al consumidor, lo que limita su identificación. Debido a ello, la PCR y sus técnicas complementarias antes mencionadas (Secuenciación, RFLP, RAPD y SSCP) juegan un papel muy importante debido a su gran especificidad.

Para prevenir el fraude y el mal etiquetado de los productos alimenticios es necesario poder identificar y cuantificar las especies empleadas en la elaboración de los alimentos procesados, pero hasta ahora, no había sido posible cuantificar de manera fiable estos constituyentes, debido a su alta susceptibilidad a las condiciones del proceso al que son sometidos. Las nuevas técnicas genéticas, en particular las que se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son muy importantes para desarrollar métodos rutinarios y "kits rápidos de análisis" ¹⁰⁴.

Uno de los productos mayormente adulterados es la carne y productos cárnicos con especies alternativas de menor costo. La sustitución de la carne ha sido un problema a lo largo de los años debido a la similitud en color y textura. Por ejemplo, la carne de cerdo es una fuente potencial para la adulteración de carnes de alto valor, tales como la de la carne de res y de cordero ^{16, 22, 91}.

Debido a la demanda de los productos cárnicos, en la actualidad algunos productores han recurrido a la extensión proteica de los embutidos mediante la adición de proteínas de origen no cárnico (soya) disminuyendo con esto el costo de producción; la adición de estos componentes son, en muchas ocasiones, no permitidos por las normas de calidad, ya que se asegura la obtención de un producto con mayor volumen pero con

menor cantidad de carne empleada. Es por ello que la autenticación de la carne es importante por más de una razón: para identificar la presencia o ausencia de especies de alto costo y para elegir un grupo étnico donde el consumo de carne de cerdo (ej. ciudades árabes) o de res (ej. India) son prohibidas por religión o salud. Para contrarrestar esta problemática varios métodos de detección están siendo usados tal como la técnica de PCR y sus técnicas complementarias (Secuenciación, RFLP, RAPD, SSCP). Estas técnicas son aplicadas dependiendo del análisis que se quiera realizar. Por ejemplo, si se quiere saber la presencia o ausencia de la carne de cerdo se usa PCR, por otro lado si se quiere saber cual especie esta presente, RFLP es la más aplicable^{9, 38, 79}.

Otro de los productos que se deben identificar son los alimentos modificados genéticamente que, desde 1996, pueden ser encontrados sobre estantes en ventas al por menor. El primer producto fue el puré de jitomate transgénico de Flavr SavrTM. Poco después se obtuvieron productos que contenían maíz o soya transgénica. Para identificar su presencia, sistemas de cebadores (primers) han sido diseñados los cuales son elemento blanco que normalmente no son homólogos, como por ejemplo los promotores o los terminadores de origen viral o bacteriano. En suma, la preocupación de los consumidores y de los activistas ha sido legislar el correcto etiquetado de los productos transgénicos, y debido a ellos en E.U. se demanda la regulación del etiquetado de productos que presenten más del 1% de material genético, y por otro lado en México no existe legislación que regule esta práctica por lo que no se tiene un control^{40, 65}.

Un alimento se considera adulterado cuando¹⁰³:

- a) Contiene alguna sustancia venenosa artificial.
- b) Contiene alguna sustancia pútrida o descompuesta.
- c) Ha sido elaborado, empacado o manipulado en condiciones no sanitarias.

- d) Contiene algún elemento no declarado en la etiqueta
- e) Se vende como si fuera un producto de alta calidad y mayor costo.

Por tal motivo, a continuación se presentan algunos alimentos que han sido autenticados por medio de la técnica de PCR haciendo énfasis en productos de la pesca debido a que hay mayor disponibilidad de secuencias genómicas en sistemas bioinformáticas y a la gran variedad de especies que se comercializan en todo el mundo.

Este proyecto pretende demostrar la importancia de realizar técnicas de Biología Molecular para la identificación de alimentos en fresco y procesado, en especial de pescados y productos de la pesca, además de mostrar algunos de los análisis de PCR que se han hecho para la identificación y autenticación de especies ¹²⁰. Algunos de las especies que han sido estudiadas y analizadas por medio de esta técnica se muestran en el siguiente cuadro:

ALIMENTOS QUE PUEDEN SER SUJETO DE ADULTERACIÓN

Cuadro 4. Alimentos analizados por la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

ALIMENTO	ESPECIE ADULTERANTE	REFERENCIA
Carne y productos cárnicos		
Autenticación de carnes rojas		Saez (2004), Gouli (1999)
Autenticación de cerdo	Jabalí, búfalo	Saez (2004), Matsunaga (1999), Montiel (2000)
Carne molida de res	Pollo y/o soya	Saez (2004), Matínez (1998)
Diferenciación de cerdo en productos cárnicos como mortadela, embutidos y jamón adulterados con carne de pollo, bovino y ovino		Saez (2004), Lahiff (2000), Matsunaga (1999),
Hamburguesas	Gluten de trigo, caseína y proteínas de soya. ⁴³	Macedo (2000)
Especies pesqueras		
Lenguado común (<i>Solea solea</i>)	* Platija Europea (<i>Pleuronectes plateas</i>) y * Platija (<i>Platichthys flesus</i>). ¹⁵ * Gallo * Bruja	Céspedes (1999)
El bacalao (<i>Gadus morhua</i>)	Bacalao <i>Gadus macrocephalus</i> , <i>Theragra chalogramma</i> ¹¹⁵	
Rapé blanco (<i>Lophies. Piscatorius</i>)	Rapé común (<i>Lophies budegassa</i>)	Sanjuán (2002)
Róbalo	Pez Dorado (<i>Status aurata</i>)	Cocolin (2000)
Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Carrera (1999)
Atún (<i>Thunnus thynnus</i>)	Bonito (<i>Sarda sarda</i>)	Rebién (1999)
Trucha arco iris (<i>Salmo irideus</i>)	Trucha asalmonada (<i>Salmo trutta</i>)	Sajedi (2003), Carrera (1999)
Lenguado (<i>Solea solea</i>)	Platija europea (<i>Pleuronectes plateas</i> , <i>Platichthys flesus</i>)	Céspedes (1998)

ALIMENTOS QUE PUEDEN SER SUJETO DE ADULTERACIÓN

Pez dorado (<i>sparus aurata</i>)	<i>Dicentrachus librax, umbrina cirrosa</i>)	Cocolin (2000)
Huso huso (<i>Caviar Beluga</i>), <i>Acipenser stellatus</i> (<i>Caviar Sevruga</i>) y <i>Acipenser gueldenstaedti</i> (<i>Caviar Osietra</i>)	Otras huevas	Wolf (1999)
Huevo de lisa	Otras huevas	Hsieh (2000)
Caracol (<i>Helix pomata</i>) scargots	Cualquier especie de caracol	Abdulmawjood (2001)
Frutas		
Jugo de naranja	Jugo de mandarina ⁶⁵	Popping (2002)
Productos procesados como yogurt, mermelada, gelatina y bebidas		Popping (2002)
Alimentos modificados genéticamente		
Puré de jitomate	Transgénico de Flavr Savr TM jitomate ⁶⁵	Popping (2002)
Productos de Maíz	Maíz transgénico	Popping (2002)
Soya	Soya transgénica	Popping (2002)

Fuente: Elaboración propia con datos de los autores mencionados.

13.1 Características de algunas especies que pueden ser adulteradas.

Como se mencionó anteriormente la identificación de especies de pescado atendiendo a criterios morfológicos es posible cuando estas conservan intactas sus características anatómicas esenciales. Sin embargo hoy en día el pescado es procesado antes de su venta al consumidor, lo que limita su identificación. Es por ello que la técnica de PCR y sus técnicas complementarias antes mencionadas (Secuenciación, RFLP, RAPD y SSCP) juegan un papel muy importante debido a su gran especificidad.

Debido a la gran variedad de especies de pescado que se comercializan en el mundo, muchos autores han analizado esta rama de los alimentos gracias a la gran disponibilidad de secuencias genómicas en sistemas bioinformáticas que facilitan su análisis por medio de la técnica de PCR, logrando con ello la identificación y autenticación de alimentos, no importando su forma de consumo (filetes, enlatados, productos cocidos, etc).

Como veremos a continuación existen algunas variedades de pescado que pueden ser sujeto de adulteración debido a la gran similitud que tienen con otras especies y al menor costo que estas pueden tener, asimismo se darán a conocer sus características morfológicas así como la especie con la que es adulterada para posteriormente presentar la metodología a seguir para la identificación de algunas de estas especies por medio de la técnica de la polimerasa.

13.1.1 Lenguado

El lenguado común (*Solea solea*), pertenece a una de las muchas de las especies de peces planos que viven en océanos tropicales y subtropicales. Al igual que otros peces planos, el lenguado es ovalado, aplanado por los lados y posee una boca dentada con labios protractiles. Se reproduce de Mayo a Agosto y las larvas libres no son planas,

sino que se parecen a los otros peces y nadan en posición vertical. Tras algunas semanas, los ojos se desplazan hacia un lado del cuerpo, que se aplana a su vez. El pez pasa a vivir junto al fondo a partir de ese momento y nada apoyándose sobre su vientre plano, adoptando su característica posición horizontal. Debido a esto, el ojo izquierdo, que corresponde al lado que está en contacto con el fondo, migra al lado derecho de la cabeza en las primeras fases de su desarrollo, y los pocos dientes que tiene en su boca pequeña y torcida se desplazan al lado ciego, como se muestra a continuación:¹¹³

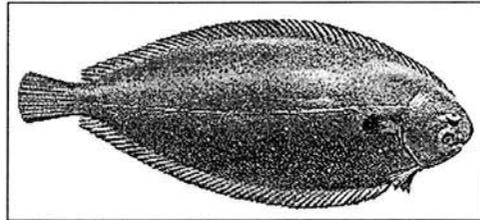


Figura 18. Lenguado

Tiene un delicado sabor y textura muscular. Debido a su alto costo, popularidad y demanda, los filetes de lenguado son altamente susceptibles a sustituciones usando especies de pescado de menor valor. Consecuentemente, hay gran necesidad de detectar malos etiquetados o sustitución fraudulenta de especies de pescado de menor valor. Esta especie puede ser adulterada con especies de Platija Europea (*Pleuronectes plateas*) y Platija (*Platichthys flesus*)¹⁵.

13.1.2 Bacalao

Como bacalao, conocemos a una de las cerca de 60 especies de una familia de valiosos peces comestibles. El bacalao vive sobre todo en mares fríos o templados del norte de México, a profundidades de entre 180 y 600 m, y emprenden largas migraciones. Muchos viven cerca del fondo. El bacalao común tiene tres aletas dorsales, dos anales, una cola no bifurcada y un pequeño bárbelo en la mandíbula inferior. Por lo general son de tamaño moderado, pero pueden llegar a pesar hasta 90 kg. y a medir 1.8 m de largo. De color gris verdoso a castaño negruzco, y en ocasiones rojo, tiene un dibujo vetado en la cabeza, el dorso y los costados. Es un depredador voraz, y se alimenta de arenques, anguilas y otros peces de aguas poco profundas. Y se esquematiza de la siguiente manera:

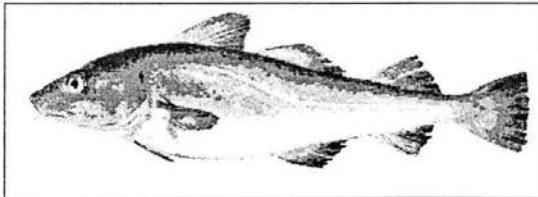


Figura 19. Bacalao

El bacalao es apreciado por su carne y como fuente de aceite de hígado de bacalao. Otras especies de importancia comercial incluyen el abadejo, el bacalao del Pacífico, muy apreciado por los japoneses y el eglefino. Este último, en particular, ha sido sobre explotado por las redes de arrastre de los grandes barcos factoría ¹¹³.

El bacalao (*Gadus morhua*) puede ser adulterado con *Gadus macrocephalus* y *Theragra chalogramma*. Este problema se da principalmente en su presentación enlatada o en algunos aceites ¹¹⁵.

13.1.3 Rape

Estos peces alcanzan más de 1.5 m de longitud. Viven en el fondo oceánico, y se arrastran por él (mediante unas aletas pectorales modificadas) para buscar alimento. Con su boca enorme y su estómago extensible, un rape puede engullir otro pez de su mismo tamaño ¹¹³. Sus características principales se muestran a continuación:

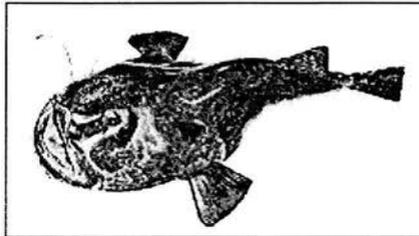


Figura 20. Rape

Los pescados Rape cuyos nombres científicos son *Lophius budegassa* (Rape común) y *L. piscatorius* (Rape blanco) del noreste del Atlántico son morfológicamente indistinguibles. El pescado *L. piscatorius* en fresco, refrigerado o congelado es algunas veces etiquetado como *L. budegassa*, debido a la gran popularidad y alta demanda de consumo de estas especies. La identificación de estos productos usando criterios no morfológicos es necesaria para evitar la sustitución de especies y para contribuir a la calidad de estos productos de una higiene sanitaria ⁷⁹.

13.1.4 Róbalo y Pez Dorado

En la última década, la producción de pescado en el Mediterráneo se ha multiplicado y varias especies de importancia económica como el Róbalo y el pez Dorado o pargo han aumentado notablemente. Como consecuencia hubo gran expansión global de estas especies además de incrementar el conocimiento del consumidor de productos de calidad. Un aspecto de interés comercial es la dificultad de distinguir entre filetes de

especie similar para prevenir sustituciones fraudulentas con especies de menor valor^{18, 39}. A continuación se presenta en dos de sus presentaciones (entero y en filete) y en este último se da mayormente la adulteración.



Figura 21. Robalo

13.1.5 Salmón

Salmón, nombre común de peces caracterizados por tener un cuerpo alargado cubierto por pequeñas escamas cicloideas (redondeadas y con bordes lisos) y una aleta adiposa (carnosa) entre la aleta dorsal y la cola. Estos peces pertenecen a una familia cuyos miembros, en su mayor parte, son muy apreciados por los pescadores deportivos y por su carne. Viven tanto en agua dulce como en agua salada en las regiones más frías del hemisferio norte. Muchos regresan del mar a los ríos para desovar, y las crías emigran de las corrientes de agua dulce al mar una vez que alcanzan la madurez. El instinto migratorio de los miembros de la familia del salmón es muy específico, y cada generación regresa a desovar al mismo lugar donde desovó la generación anterior (véase Migración animal). Incluso las especies que no migran del agua dulce al agua salada desovan en las mismas corrientes de agua dulce que sus antecesores. El área de desove de estos peces suele ser una corriente rápida y clara con fondo de grava y rocas⁹⁶.

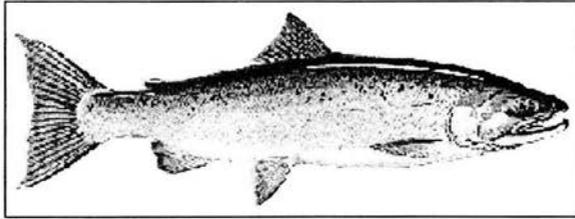
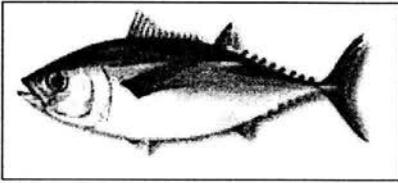
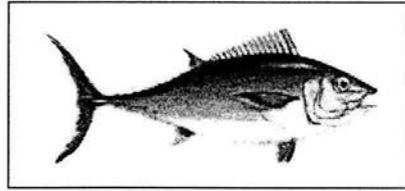


Figura 22. Salmón

Dos especies de la familia del salmonidae, *Oncorhynchus* y *Salmo* son importantes y frecuentemente son usadas para productos ahumados en los cuales las características externas son modificadas, la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y el Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) difieren en valor, de los cuales es más barata la trucha y por tanto es un adulterante en los productos de Salmón. La principal presentación en la que se puede dar la sustitución de esta especie por otra, es en el caso del ahumado o como pasta fina ¹¹.

13.1.6 Atún y bonito

El bonito (*Sarda sarda*) es un pez de aguas templadas y tropicales, muy codiciado y pescado como alimento en la costa este del Pacífico, la zona tropical del Atlántico, la región del Mediterráneo y en torno a Australia. Emparentado con el atún (*Thunnus thynnus*) y la caballa, el cuerpo del bonito tiene forma hidrodinámica y es de color azul plateado con diminutas escamas y dos aletas dorsales. La aleta dorsal trasera y la aleta anal van seguidas de varias aletas pequeñas. Puede pesar hasta 10 kg. y alcanzar una longitud de más de 1 m. Debido a esta similitud el atún es adulterado con esta especie ¹¹². A continuación se puede observar algunas de sus diferencias fisiológicas:

**Bonito del Atlántico****Atún****Figura 23.** Atún y Bonito

El bonito tiene un precio de importancia más bajo que el Atún, por lo que se sospecha que parte del atún en conserva se sustituye con bonito en lugar de atún³¹.

13.1.7 Merluza

La merluza peruana es un recurso hidrobiológico en plena explotación, de importancia económica y social, especialmente para la costa norte del Perú. La similitud morfológica observada entre distintas especies de merlúcidos, dificulta su distinción, para determinar la estructura poblacional en base a diferencias morfológicas. Se ha asumido la existencia de un solo stock de merluza en el Perú, y en base a este criterio se realizan las acciones de gestión pertinentes (tasa de captura, periodos de veda) recomendadas por el Instituto del Mar del Perú. La propuesta de la hipótesis de los dos stocks de merluza, plantea un problema en la gestión del recurso. La expresión de los caracteres fenotípicos (talla, tiempo de madurez, régimen alimentario, coloración, morfología, otros) se modifican o cambian durante el ciclo vital del individuo debido a que depende de diversos factores. En cambio el genoma del individuo es constante durante su ciclo vital. Usadas a nivel poblacional se agrupan variantes genéticas, las cuales pueden ser usadas como grupos de parentesco en la determinación de la

estructura poblacional de peces es la región hipervariable del DNA ¹⁰³. Su figura se muestra a continuación.

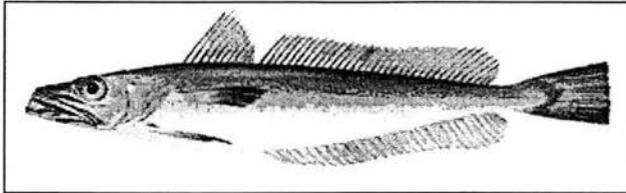


Figura 24. Merluza

13.1.8 Caviar

El caviar de esturión es uno de los productos más exclusivos y costosos de los productos pesqueros. Debido al creciente interés y a la gran sobre pesca de las tres especies de esturión comercial: *Huso huso* (Caviar Beluga), *Acipenser stellatus* (Caviar Sevruga) y *Acipenser gueldenstaedti* (Caviar Osietra), en 1998 estas especies fueron catalogadas en el Apéndice II de la Convención de Comercio Internacional en especies en peligro de flora y fauna silvestre (CITES) ^{23, 63, 94}.

Las tres especies antes mencionadas de caviar son particularmente vulnerables debido a la gran demanda de sus huevos. Como resultado, el tamaño de la población de especies de esturión comercial ha caído dramáticamente durante los pasados años y se ha sugerido que la oportunidad de supervivencia del esturión puede ser en cautiverio ⁶³.

Tradicionalmente los comerciantes identificaban el caviar en crudo con factores tales como el tamaño del huevo, la apariencia, el olor, la textura y el color de la hueva pero recientes estudios han demostrado que con estas medidas es fácil de ser adulteradas lo que llevó a la identificación por medio de técnicas de Biología molecular como PCR ⁶³.

Finalmente, se puede decir que la principal forma en que se presenta la sustitución o adulteración de especies pesqueras con otras de menor valor y características similares, son en el procesado como el ahumado, enlatado o en forma de filete.

13.1.9 Especies cárnicas

Uno de los productos mayormente adulterados es la carne y productos cárnicos con especies alternativas de menor costo. La sustitución de la carne ha sido un problema a lo largo de los años debido a la similitud en color y textura. Por ejemplo, la carne de cerdo es una fuente potencial para la adulteración de carnes de alto valor, tales como la de la carne de res y de cordero ^{16, 22, 91}.

Debido a la demanda de los productos cárnicos, en la actualidad algunos productores han recurrido a la extensión proteica de los embutidos mediante la adición de proteínas de origen no cárnico (soya) disminuyendo con esto el costo de producción; la adición de estos componentes son, en muchas ocasiones, no permitidos por las normas de calidad, ya que se asegura la obtención de un producto con mayor volumen pero con menor cantidad de carne empleada. Es por ello que la autenticación de la carne es importante por más de una razón: para identificar la presencia o ausencia de especies de alto costo y para elegir un grupo étnico donde el consumo de carne de cerdo (ej. ciudades árabes) o de res (ej. India) son prohibidas por religión o salud. Para contrarrestar esta problemática varios métodos de detección están siendo usados tal como la técnica de PCR y sus técnicas complementarias (Secuenciación, RFLP, RAPD, SSCP). Estas técnicas son aplicadas dependiendo del análisis que se quiera realizar. Por ejemplo, si se quiere saber la presencia o ausencia de la carne de cerdo se usa PCR, por otro lado si se quiere saber cual especie esta presente, RFLP es la más aplicable ^{9, 38, 79}.

13.1.10 Alimentos modificados genéticamente

Otro de los productos que se deben identificar son los alimentos modificados genéticamente que, desde 1996, pueden ser encontrados sobre estantes en ventas al por menor. El primer producto fue el puré de jitomate transgénico de Flavr SavrTM. Poco después se obtuvieron productos que contenían maíz o soya transgénica. Para identificar su presencia, sistemas de cebadores (primers) han sido diseñados los cuales son elemento blanco que normalmente no son homólogos, como por ejemplo los promotores o los terminadores de origen viral o bacteriano. En suma, la preocupación de los consumidores y de los activistas ha sido legislar el correcto etiquetado de los productos transgénicos, y debido a ellos en E.U. se demanda la regulación del etiquetado de productos que presenten más del 1% de material genético, y por otro lado en México no existe legislación que regule esta práctica por lo que no se tiene un control^{40. 65}.

14. Condiciones de amplificación de especies alimentarias analizadas por PCR.

Como pudimos ver, muchas son la especies que pueden ser adulteradas debido a que tienen similitud con otras especies ya sea del mismo género y/o variedad por lo que se dice son filogenéticamente similares. Aunque en la actualidad muchos países europeos han realizado trabajos de autenticación de especies de pescado gracias a las amplias bases de datos disponibles, en ocasiones es imposible de llevar a cabo ya que hay muchas especies de pescado de las que no se conoce ninguna secuencia y por otro lado su también escasa utilización en la identificación de especies de carne de las que sí existe mayor información en las bases datos podría justificar lo poco que se ha utilizado la técnica de PCR en especies cárnicas y algunas otras variedades de pescado.

El uso de *primers* específicos de especie en la PCR es un método rápido para la identificación de muestras y puede también ser útil par poder reconocer simultáneamente varias especies. Pudiendo detectar la sustitución de carnes más baratas de las costosas y en donde la detección cualitativa de mezclas puede ser posible. Obviamente el conocimiento previo de la secuencia es necesario para un buen diseño de los *primers*.

Cuando la PCR es realizada sin *primers* específicos de especie, algunas técnicas secundarias son necesarias realizar. Secuenciando los productos de PCR, producirá una cantidad de información relativamente grande, requiriendo una buena capacidad de manejo de datos. Los analistas de RFLP para los productos de PCR han sido extensamente usados para la diferenciación de especies ya que un simple par de *primers* puede producir un fragmento que puede ser usado para la identificación de múltiples especies con utilización de enzimas de restricción.

Como veremos a continuación, muchas especies de pescado han sido identificadas por medio de los análisis por PCR y en algunos casos con la ayuda de una técnica complementaria como lo son las técnicas de Secuenciación y RFLP que han sido

mayormente empleadas es este tipo de alimentos. Alternativamente se presenta la metodología a seguir para la identificación de algunas especies cárnicas que han sido realizados. Dicha metodología presentará la región amplificada y, en algunos casos, las enzimas de restricción empleadas para un análisis de RFLP.

14.1 Especies de Atún

Cuadro 5. Análisis de PCR en especies de atún.

ESPECIE	REGIÓN	PRIMERS	ANÁLISIS COMPLEMENTARIO
Albacore (<i>Thunnus alalunga</i>)	• Citocromo b	5' – AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A – 3'	* Análisis de SSCP mezclando un fragmento del DNA amplificado con una solución desnaturalizante. * Realizar electroforesis en gel de polilacrilamida
Atún aleta amarilla (<i>Thunnus albacares</i>)			
Skipjack tuna (<i>Katsuwonus pelamo</i>)			
Atún aleta azul (<i>Thunnus thynnus</i>)			
Caballa fragata (<i>Auxis thazard</i>)			
Atún pequeño (<i>Euthynnus alleteratus</i>)			
Bonito (<i>Sarda sarda</i>)			
Atún bigeye (<i>Thunnus obesus</i>)			

Fuente: Hartmut Rebién, Ianm (1999)⁵⁹

14.2 Especies de Trucha arcoiris

Cuadro 6. Análisis de PCR – RFLP en trucha arcoiris.

ESPECIE	REGION	PRIMERS	ANALISIS COMPLEMENTARIO
<i>Trout Rainbow</i>	D- loop	<p>ND_{5/6}: ND_L: 5' - TCA TCC ATT GGT CTT AGG AAC C - 3' Tm =62°C</p> <p>ND_G: 5' – CAA CGG TGG TTC TTC AAG TCA – 3' Tm = 62°C</p> <p>tRNA_{Val}-12SrRNA- tRNA_{phe}-D-loop-tR- NA_{pro}-rRNA_{tyr}-300pb de gen cyt b</p> <p>DL_V: 5' – GTG ACC CGA TTT GCA CGG – 3' (Tm = 58°C)</p> <p>DL_B: 5' – CTA CGA TCC ATC CCC AAC -3' (Tm = 56°C)</p> <p>Los primers son sintetizados con AB1391 DNA sintetasa ¹¹¹</p>	<p>* Análisis de RFLP * Endonucleasas de restricción (Acc I, Alu I, Del I, Eco RI, Hha I, Hind III, Hpa II, Mn II, Msp I, Nci I, Nla IV, Itaq I) y los fragmentos de ND_{5/6} por 10 endonucleasas de restricción (Alu I, Ava I, Ava II, Ban II, Bst NI. Hae III, Hgic II, Hinf I, Nla IV, Nsp BII, Pst I, Rsa I, ScrI II, Taq I y Xho I).</p>

Fuente: R.H. Sajedi, S.Aminzadeh. H. (2003) ¹¹

Cuadro 7. Análisis de PCR –RFLP en especies de trucha.

ESPECIE	REGION	PRIMERS	ANALISIS COMPLEMENTARIO
<i>Oncorhynchus keta</i> <i>O. Kisstch</i> <i>O. gorbuscha</i> <i>O. nerka</i> <i>O. tschawytscha</i> <i>O. mykiss</i> <i>Salvelinus alpinus</i> <i>Salvelinus fontinalis</i> <i>Salmo trutta</i> <i>Salmo salar</i>	Citocromo b	L14735 5'-aaa aac cac cgt tgt tct tca act a-3' H15149 5'-gct cct cag cat gat att tgt cct ca-3'	* Análisis de RFLP * Digerir con las siguientes endonucleasas de restricción: Dde I, Nla III, Hae III, Bsp I28GI, Eco RII, Sau3A I.

Fuente: Valerie (2000)

14.3 Salmón del Atlántico

Cuadro 8. Análisis de PCR-RFLP en Salmón del Atlántico.

ESPECIE	REGION	PRIMERS	ANALISIS COMPLEMENTARIO
Salmón del atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Citocromo b	16S – 1: 5'–CAC CAC AAC ATA CAT ACC C – 3'	* Análisis de RFLP * Digerir los productos de PCR con las siguientes endonucleasas <i>HpaI</i> y <i>Bst EII</i> .
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)		16S – 2: 5'-CGT TAA ACC CAT AGT CAC AG-3'	

Fuente: E. Carrera.T.García (1999)¹¹

14.4 Filete de pescado

Cuadro 9. Análisis de PCR-RFLP en filete de pescado.

ESPECIE	REGION	PRIMERS	ANALISIS COMPLEMENTARIO
<i>Dicentrachus labrax</i> L	Citocromo b	5' – CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA – 3'	* Análisis de RFLP *Digerir con las siguientes endonucleasas: <i>Alu I</i> , <i>Hae III</i> , <i>Hinf. I</i> , <i>Mbo II</i> , <i>Nla III</i> , <i>Rsa I</i> , <i>Taq I</i> .
<i>Sparus aurata</i> L			
<i>Umbrina cirrosa</i> L			
<i>Dentex dentex</i> L		5' – CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A – 3'	

Fuente: L.Cocolin, E.D'Agaro.M. (2000)¹⁸

14.5 Especies de pez planos

Cuadro 10. Análisis de PCR-RFLP en especies de pez plano.

ESPECIE	REGION	PRIMERS	ANALISIS COMPLEMENTARIO
Lenguado (<i>Solea solea</i>) Platija Europea (<i>Pleuronectes platessa</i>) Platija (<i>Platichthys flesus</i>)	Citocromo b	5' – cca tcc aac atc tca gca tga tga ca – 3'	* Análisis de RFLP * Digerir con las siguientes endonucleasas de restricción: <i>Hinf I</i> , <i>Nci I</i> , <i>Sau 3A I</i>
		5'- ccc ctc aga atg ata ttt tgt ctc a – 3'	

Fuente: Céspedes (1998)¹⁵

14.6 Diferentes especies pesqueras.

Cuadro 11. Análisis de PCR-RAPD en diferentes especies de pescado.

ESPECIE	REGION	PRIMERS	ANALISIS COMPLEMENTARIO
Baramundi (<i>Lates calcarifer</i>) Perca del Nilo (<i>Lates niloticus</i>) John dory (<i>Zeus faber</i>) Silver dory (<i>Cyttus australis</i>) Mirror dory (<i>Zenopsis nebulosis</i>) Warty oreo (<i>Allocttus verrucosus</i>) Spiky oreo (<i>Neocyttus rhomboidalis</i>) Smooth oreo (<i>Pseudocyttus maculates</i>)	Citocromo b	5' – gga aac agc tat gac cat g – 3'	* Análisis de RAPD

Fuente: Lina Partis (1996)⁶²

14.7 Diferentes especies de caviar.

Cuadro 12. Análisis de PCR-RFLP en especies de caviar

ESPECIE	REGION	PRIMERS	ANALISIS COMPLEMENTARIO
Beluga (<i>Huso huso</i>)	Citocromo b	L14735: 5' - AAA AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT A - 3'	* Análisis de RFLP * Digerir con las siguientes endonucleasas: Nla III, Rsa I, Ssp I, Tru 91, 10 U de cada enzima, por 1-2 horas.
Sevruga (<i>Acipenser stellatus</i>)			
Osietra (<i>Acipenser gueldenstaedti</i>)			
<i>A. schrencki</i>			
<i>A. nacari</i>			
<i>A. nudiventris</i>			
<i>A. persicus</i>			
<i>A. ruthenus</i>			
<i>A. baerii</i>			
<i>A. sturio</i>			

FUENTE: Christian Wolf, Philipp Hübner. (1999)²⁴

14.8 Scargots

Cuadro 13. Análisis de PCR en scargots.

ESPECIE	REGION	PRIMERS
<i>Helix pomatia</i> <i>Helix lucorum</i>	12S rRNA	12SAI 5'-aaa cta gga tta gat acc cta tta t-3' 12SBI 5'-aag agc gac ggg cga tgt gt-3' UNI 12S-I 5'-atc ttt agg gga act tac-3' UNI 12SII 5'-ata act att act ttt aag tcc-3'
	16S rRNA	16 SAR 5'-cgc ctg ttt aac aaa aac at-3' 16 SBR 5'-ccg gtc tga act cag atc atg t-3' UNI 16S-I5'-gtg caa agg tag cat aat cac-3'UNI 16S-II 5'-cct att aaa att atg ctg tta tcc-3' 16 SAR/ 5'-cgc ctg ttt aac aaa aac at-3' Pom-sp 5'- cgc ctg ttt aac aaa aac at-3' 16 SAR/ 5'-cga aaa aat gtg cta aga cag-3' Luc-sp 5'-gtc ttc tgg tct ttt tta gc-3
	Citocromo b	Cytb-I 5'-cca tcc aac atc tca gca tga tga aa-3' Cytb-II Ccc ctc aga atg ata ttt gtc ctc a-3'

Fuente: Abdulmawjood A (2001)¹

14.9 Diferentes especies de carne.**Cuadro 14.** Análisis de PCR en carne de Bovino.

ESPECIE	REGION	PRIMERS
Vaca	Citocromo b	5' – TGT ACG AAG AAA TGT GCG G –3' 5' – TCA ATG CAA AGG ACA AGC CTGC – 3'

FUENTE: Gouli, Zhang, (1999)³⁰**Cuadro 15.** Análisis de PCR en ovino, bovino, porcino y pollo.

ESPECIE	REGIÓN	PRIMERS
<i>Pollo</i> <i>Bovino</i> <i>Ovino</i> <i>Porcino</i>	Citocromo b	Pollo: 5'- ggg aca ccc tcc ccc tta atg aca – 3' 5' – gga ggg ctc gaa gaa gga gtc – 3' Bovino: 5'- gcc ata ctc tcc ttg gtg aca -3' 5'- gta ggc ttg gga ata gta cga -3' Porcino: 5'- gcc taa atc tcc cct caa tgg ta -3' 5'- atg aaa gag gca aat aga ttt tcg -3' Ovino: 5'- tta aag act gag agc atg ata -3' 5'- atg aaa gag gca aat aga ttt tcg -3'

FUENTE: Lahiff, S. (2000)³⁸

Cuadro 16. Análisis de PCR en cabra, ganado vacuno, oveja, cerdo, pollo.

ESPECIE	REGION	PRIMERS
<i>Cabra</i>	Citocromo b	Primer en común SIM 5'-gac ctc cca gct cca tca aac atc tca tct tga tga aa-3'
<i>Pollo</i>		Cabra 5'-ctc gac aaa tgt gag tta cag agg ga-3'
<i>Ganado vacuno</i>		Pollo 5'-aag ata caga tg aag aag cat gag gcg-3'
<i>Oveja</i>		Vaca 5'-cta gaa aag tgt aag acc cgt aat ata ag-3'
<i>Cerdo</i>		Oveja 5'-cta tga atg ctg tgg cta ttg tcg ca-3'
		Cerdo 5'-gct gat agt aga ttt gtg atg acc gta-3'
	Caballo 5'-ctc aga ttc act cga cga ggg tag ta-3'	

Fuente: Matsunaga (1999)⁵⁰**Cuadro 17.** Análisis de PCR-RAPD en cerdo, res, cordero, pollo, pavo

ESPECIE	REGION	PRIMERS	ANALISIS COMPLEMENTARIO
<i>Cerdo</i> <i>Res</i> <i>Cordero</i> <i>Pollo</i> <i>Pavo</i>	Citocromo b	OPL-04 5'-gac tg caca c-3' OPL-05 5'-acg cag gca c-3'	Análisis de RAPD

Fuente: Saez R. (2004)⁷⁶

14.10 Champiñones

Cuadro 18. Análisis de PCR-RFLP en champiñones.

ESPECIE	REGION	PRIMERS	ANALISIS COMPLEMENTARIO
<i>Flammulina velutipes</i>	5.8S rDNA y una porción del 28S rDNA	ITS1 5'-tcc gta ggt gaa cct gct g-3' ITS4 5'-tcc tcc gct tat tga tat gc-3'	* Análisis de RFLP * Digerir con las siguientes endonucleasas de restricción: Dra I, Fak I, Hae II, Mbo II, Nla IV.

Fuente: Palapa (2002)⁶¹

CONCLUSIONES

De acuerdo a toda la información anterior concluyo que los análisis de identificación y autenticación de especies que utilizan técnicas de Biología molecular empleando ácidos nucleicos, en especial la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ofrecen mayores ventajas que las que utilizan proteínas para su estudio. Dichas ventajas pueden ser resumidas en tres puntos:

- 1) Es una técnica poderosa y específica lo que permite la detección de especies a partir de cantidades muy pequeñas de muestra.
- 2) Debido a que los ácidos nucleicos y en particular el DNA mitocondrial es una molécula más termoestable que las proteínas permite su aplicación en alimentos procesados térmicamente.
- 3) El DNA mitocondrial (mtDNA) ha sido preferido en estos estudios con respecto al DNA nuclear (nDNA) debido, entre otras cosas, a una mayor variabilidad intraespecífica, lo que permite mayor posibilidad de reconocer diferencias aún entre especies filogenéticamente cercanas; puesto que existen cientos de copias por cada célula; el conocimiento de la organización y la amplia disponibilidad de secuencias de las principales especies.

En lo que se refiere al ámbito pesquero se han abierto grandes alternativas de estudio puesto que existen gran variedad de especies comercializadas en todo el mundo, lo cual ha facilitado la adulteración de especies de alto valor económico con especies de menor valor, engañando con esto al consumidor el cual tiene todo el derecho de saber qué es lo que consume. Por tal motivo la técnica de PCR es muy útil gracias a que puede identificar una posible adulteración de especies incluso si están relacionadas filogenéticamente con la ayuda de técnicas complementarias como la secuenciación y el RFLP. Estas técnicas son muy rápidas, seguras y no requieren de grandes

cantidades de muestra lo que facilita a los analistas su aplicación tanto en la industria como en los laboratorios.

Es importante hacer notar que en Europa, EEUU y algunos países desarrollados se han establecido algunas normas y estatus que regulan la correcta elaboración de productos pesqueros, siendo además los que mayor número de trabajos de identificación y autenticación de especies por medio de la amplificación de regiones específicas del DNA mitocondrial utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha realizado y por otro lado los hechos reales indican que en México, el panorama es aún más complicado por tratarse de un país en desarrollo terriblemente dependiente de lo económico por lo que no existe información publicada de trabajos que utilicen estas técnicas en productos pesqueros, lo que abre un panorama importante de posibilidades para los interesados en este campo de la Biotecnología, ya que nuestro país cuenta con gran variedad de especies pesqueras que se comercializan y consumen, tal es el caso de especies como el guachinango, bacalao, lisa, mojarra, etc., los cuales deben ser etiquetados correctamente en la cual la información deba ser clara, verídica, suficiente y no debe generar confusión al consumidor.

Es necesario que en nuestro país se reconozca y emplee la técnica de PCR amplificando el DNA mitocondrial en este tipo de trabajos que permita asegurar el correcto etiquetado de los productos, la evidencia de una posible adulteración, la correcta asignación de una denominación de origen, etc. Todo esto concretando en mejores prácticas de control de calidad en productos que se comercializan y consumen en México y es aquí donde el Ingeniero en Alimentos, como practicante activo de las cadenas agroindustriales alimentarias para la producción y distribución de alimentos, no debe permanecer indiferente ante esta problemática sino al contrario debe adoptar una actitud de ética leal no permitiendo que se cometan este tipo de prácticas fraudulentas, más aún puede ser el encargado de realizar análisis de autenticación por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

ANEXO 1

**ETIQUETADO DE ALIMENTOS EN LA COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS
(CODEX)**

Por Ellen Matten, analista de política internacional, Oficina de Estados Unidos del CODEX

El comercio internacional de alimentos aumentó drásticamente durante el siglo XX. Al mismo tiempo, los países adoptaron de manera independiente conjuntos diferentes de leyes y normas, causando impedimentos en el comercio que han sido la preocupación creciente de los comerciantes de alimentos.

Como resultado de esas preocupaciones, dos organizaciones de las Naciones Unidas, la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), crearon en 1962 la Comisión del Codex Alimentario. Los organizadores pensaron que si todos los países armonizaban sus leyes sobre alimentos y adoptaban estándares internacionales, estas cuestiones podrían ser encaradas de manera natural. Imaginaron que debido a la armonización habría menos impedimentos al comercio y un movimiento más libre de productos alimentarios entre los países, lo que beneficiaría a los agricultores y a sus familias y ayudaría a reducir el hambre y la pobreza. El Codex se ha convertido en el principal mecanismo internacional para alentar el comercio internacional justo de alimentos y al mismo tiempo promover la salud y los intereses de los consumidores.

El Codex tiene una importancia especial en el siempre creciente mercado mundial de alimentos. Las ventajas de tener normas universales uniformes para proteger a los consumidores son evidentes. Las normas del Codex se han convertido en el patrón de referencia contra las cuales se evalúan las medidas y normas nacionales alimentarias dentro de los parámetros legales.

La Comisión del Codex Alimentarius creó en 1965 el Comité Codex de Etiquetado de Alimentos. La comisión reconoció que el etiquetado de alimentos es el medio primario de comunicación entre el productor y el vendedor de alimentos por un lado y el comprador y el consumidor por el otro. El comité trata de resolver cuestiones difíciles cuando sistemas múltiples de etiquetado pueden causar obstáculos al comercio. Las cuestiones actualmente ante el comité incluyen las etiquetas de país de origen, el etiquetado de alimentos derivados de la biotecnología moderna y las etiquetas engañosas de alimentos.

Etiquetas del país de origen

Muchos países tienen el requisito de etiquetas de "país de origen" para productos que se venden en esos países. En la Norma General del Codex para el Etiquetado de Alimentos Preempacados actual hay un requisito de etiqueta de país de origen cuando su omisión podría ser mal interpretada o engañar al consumidor. La mayoría de los países, incluso Estados Unidos, han adoptado requisitos normativos para las etiquetas de país de origen de los alimentos.

Expandir los requisitos de etiquetas de país de origen para que incluyan además del origen del alimento el origen de los ingredientes del alimento es particularmente problemático para algunos países. Los proveedores pueden conseguir los ingredientes en diferentes países, de fuentes distintas y durante las distintas épocas del año o de países múltiples y debido a ello sus orígenes podrían estar mezclados. Las variaciones en la disponibilidad de ingredientes así como su calidad afectan las decisiones de uso y manufactura por parte de las compañías de alimentos. A los productores de ingredientes, corredores, productores y procesadores de alimentos se les exigiría que segregaran ingredientes de distintos países para asegurar la conformidad completa con los requisitos de origen de los ingredientes y mantener una miríada de etiquetas que correspondan a todas las mezclas o combinaciones posibles de fuentes de ingredientes. Debido a esto, la tarea de armonización internacional de las reglas de origen se ha venido realizando durante varios años en la Organización Mundial del Comercio (OMC), con la asistencia técnica de la Organización Mundial de Aduanas, como parte del Acuerdo de la OMC sobre Reglas de Origen concluido en 1994 ²⁹.

GLOSARIO

Aminoácido: Unidad monomérica fundamental de las proteínas. Existen 20 tipos diferentes.

Anticodon: Una secuencia específica de tres nucleótidos en un RNA de transferencia (tRNA), complementario a un codón (también tres nucleótidos) para un aminoácido en un RNA mensajero.

Apareamiento: Proceso por el cual los pares de bases complementarios en las hebras de DNA se combinan.

Célula haploide: Una célula que contiene solamente un juego o la mitad del número habitual (diploide) de cromosomas.

Célula somática: Cualquier célula del cuerpo de un organismo con excepción de las células germinales.

Clon: Una réplica genética exacta de un gen específico o de un organismo.

Clonación celular: Proceso de multiplicación de células genéticamente idénticas, a partir de una sola célula.

Clonación de genes: Técnica que consiste en multiplicar un fragmento de DNA recombinante en una célula huésped (generalmente una bacteria o una levadura) y aislar luego aislar las copias de DNA así obtenidas.

Clonación molecular: Inserción de un segmento de DNA ajeno, de una determinada longitud, dentro de un vector que se replica en un huésped específico.

Codificación: Proceso de convertir el diseño orgánico de un programa en una representación detallada o precisa del mismo, en un lenguaje adecuado.

Codón: Un triplete de nucleótidos (tres unidades de ácido nucleico seguidas) que codifica para un aminoácido o una señal de terminación.

Dímero: Especies moleculares formadas por la unión de dos moléculas iguales.

DNA complementario (cDNA): Un DNA de cadena simple que es complementario a una cadena de mRNA. El DNA es sintetizado in Vitro por una enzima conocida como transcriptasa inversa. Luego, una segunda cadena de DNA es sintetizada por la enzima conocida como DNA polimerasa.

DNA polimerasa: Una enzima que sintetiza una cadena doble de DNA. Lo logra catalizando la adición de residuos de deoxirribonucleósidos al extremo 3' de la cadena de DNA comenzando a partir una mezcla de las bases trifosforiladas apropiadas, las cuales son dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Esta reacción química es reversible y, por lo tanto, la DNA polimerasa también funciona como exonucleasa.

DNA recombinante: término que se usa en la tecnología aplicada para obtener moléculas de DNA híbridas, por ejemplo, provenientes de diverso seres vivos.

Elusión: Liberación de una sustancia fijada por adsorción sobre un soporte fijo.

Endonucleasa (enzima de restricción): Un tipo de endonucleasa que corta el DNA después de reconocer una secuencia específica.

Exón: El segmento de un gen eucariótico que es transcrito a mRNA; codifica para un dominio específico de una proteína.

Genoma: Término que denota a todo el material genético vivo. En un ser humano, por ejemplo, se refiere a todas las secuencias de todos los cromosomas de una célula.

Haploide: Posesión de la mitad de la dotación cromosómica diploide o dotación cromosómica completa, como en los gametos maduros.

Heterocigoto: Individuo que tiene dos alelos distintos en uno o varios locus y, en consecuencia, produce gametos de 2 o más diferentes tipos.

Hibridación Southern (Southern Blot): Una prueba que es realizada en muestras de DNA. Se utiliza la electroforesis en gel para separa los fragmentos de DNA de acuerdo con su tamaño y entonces son transferidos a un filtro de nitrocelulosa (blot). Se añaden sondas de DNA o RNA etiquetadas respectivamente, y aquellas que sean complementarias se unirán por hibridación con los fragmentos respectivos de DNA en el filtro. La localización de estas sondas radioetiquetadas puede ser interpretada para determinar la naturaleza del DNA en la muestra analizada.

Híbrido: Vástago de progenitores genéticamente distintos.

Holoenzima: Sistema enzimático considerado en su conjunto, constituido por una fracción proteica (apoenzima) y otra no proteica (coenzima).

Homocigoto: Individuo que tiene alelos idénticos en uno o varios locus y, en consecuencia produce gametos de igual tipo.

Interferón: Una familia de proteínas pequeñas que estimulan resistencia a virus en las células.

Intrón: Una secuencia no codificante de DNA en un gen, la cual inicialmente se transcribe a RNA mensajero y posteriormente es escindida.

Locus: Posición determinada de un gene en un cromosoma.

Mutación: Cambio brusco en el genotipo de un organismo, no debido a recombinación; material genético que puede sufrir alteración cualitativa, cuantitativa o de reordenación.

Primer (cebador): Un fragmento corto de DNA o RNA ligado a un DNA de cadena simple a partir del cual la polimerasa extiende una nueva cadena de DNA para producir una molécula doble.

Fuente

<http://biotechterms.org>

<http://www.bioxamara.tuportal.com>

<http://lectura.ilce.edu.mx.3000>

REFERENCIAS

- 1.- Abdulmawjood and Bulte M., 2001. Snail species identification by PCR-RFLP and designing of species-specific oligonucleotide primers. *Journal of food Science* 66(9): 1287-1292.
- 2.- Aranda, E., Martín, A, Díaz., M.C, Rodríguez., M.M, Núñez F. and Córdoba J.J., 1999. Técnicas de ácido nucleicos para la detección de *C. Botulinum* en alimentos. *Alimentaria* 36: 45-50
- 3.- Bartlett, S.E., Davidson W., 1991. Identification of *thunnus tuna* species by the polymerase chain reaction a direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b gene. *Can. Journal of Fish. Aquatic Science* 48(2): 309-317
- 4.- Bartlett, S.E., Davidson W., 1992. FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing) a procedure for identify the animal origin of biological specimens. *Biotechniques* 12: 408-411
- 5.- Bossier, P., 1999. Authentication of seafood products by DNA patterns. *Journal of food Science* 64(2): 189-193.
- 6.- Bremner Allan H., 2000. Safety and quality issues in fish processing. *CRC. Press.* Pp. 450-458.
- 7.- Brodman, P. D., & Moor D., 2003. Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos Taurus*) and detection of the family Mammalian in food and feed. *Meat Science* 65: 599-607
- 8.- Busse, H. J., Denner, R. B., Lubitz W., 1996. Clasification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods use un bacterial systematics. *Journal of Biotechnology* 47: 3-38
- 9.- Calvo, J. H., Zaragoza, P., & Osta R., 2001. Random amplified polymorphic DNA fingerprintings for identification of species in poultry pate. *Poultry Science* 80: 522-524.
- 10.- Carney, B.I., Gary, A.K., Gharrett, A.J., 1997. Mitochondrial DNA restriction site variation within and among five populations of Alaskan Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can J. Fish. Aquat. Sci.* 54 (7): 940-949

- 11.- Carrera, E., García, T., Céspedes, A., González, I., Fernández, A., Hernández, P.E., and Martín, R., 1999. Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identity authentication. *Journal of food Science* 64(3): 410-413.
- 12.- Céspedes, A., García, T., Carrera, E., González, I., Fernández, A., Asensio, L., Hernández y Marín R., 2000. Genetic differentiation between sole (*Sole solea*) and Greenland halibut (*Reinhardmus hippoglossoides*) by PCR-RFLP analysis of a RNA fragment. *Journal of Science Food Agriculture* 80: 29-32
- 13.- Céspedes, A., García, T., Carrera, E., González, I., Fernández, A., Asensio, L., Hernández y Marín R., 1999. Identificación de especies de pescado: Técnicas genéticas. *Alimentaria* 36 (305): 67-82
- 14.- Céspedes, A., García, T., Carrera, E., González, I., Fernández, A., Asensio, L., Hernández y Marín R., 1999. Identificación de especies de pescado: Técnicas de proteínas. *Alimentaria* 36 (305): 55-66
- 15.- Céspedes, A., García, T., Carrera, E., González, I., Sanz, B., Pablo, E., Hernández and Martín R., 1998. Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of the cytochrome b gene. *Journal of food Science* 63(1): 206-208.
- 16.- Chen, F.C., Hsieh, Y.H.P., & Bridgman, R.C., 1998. Monoclonal antibodies for porcine thermal-stable muscle protein for detection of pork in raw and cooked meat. *Journal of Food Science* 63(2): 201-205.
- 17.- Chich-Sheng Lin., Yu-Lin Sun., Chang-Yeu Liu., Ping-Cheng Yang., Ling-Chu Chang., Ivan-Cheng Cheng., Simon, J.T., Mao., Mu-Chiou Huang., 1999. Complete nucleotide sequence of pig (*Sus scrofa*) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence within Artiodactyla. *Gene* 236: 107-114
- 18.- Cocolin, L., D'Agaro, M., Manzano, D., Lonari and Comi G., 2000. Rapid PCR-RFLP method for the identification of marine fish fillets (*Seabass, Seabream, Umbrine, and Dentex*). *Journal of food Science* 65 (7): 1315-1317.
- 19.- Cordoba, J., Collins, M.D., and East A.K., 1995. Studies on the genes encoding botulinum neurotoxin type A of *C.botulinum* from a variety of sources. *System. App. Microbiol.* 18: 13-22

-
- 20.- Dalla Valle, L., Zanella, L., Belvedere, P., Colombo, L., 2002. Use of random amplification to develop a PCR detection method for the causative agent of fish pasteurellosis, *Photobacterium damsela* subsp. Piscicida (*Vibrionaceae*). *Aquaculture* 207: 187-202.
- 21.- Dellinger, M., Geze, M., 2000. Detection mitochondrial DNA in living animal cells with fluorescent microscopy. *Journal of Microscopic*. 204: 196-202
- 22.- Dennis, M.J., 1998. Recent developments in food authentication. *The Analyst* 123(9): 151R-156R
- 23.- DeMeulenar, T., & Raymakers, C., 1996. Sturgeons of the caspian sea and the international trade in caviar. *Cambridge, UK: Traffic International*.
- 24.- D'Ocon Navaza Ma., Carmen, García García Ma.José, Saavedra, Vicente García José Carlos., 1999. Fundamentos y técnicas de análisis bioquímico: principios de análisis instrumental. Parainfo. Madrid, España. Pp. 110-115.
- 25.- Field, K. G., Gordon, D., Wright, T., Rappe, M., Urback, E., Vergin, K., Giovannoni, S. J., 1997. Diversity and depth-specific distribution of SAR 11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* 63: 63-70
- 26.- Gelsominio, R., Vancanneyt, M., Condon, S., Swings, J., Cogan, T.M., 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish cheddar-type cheesemaking factory. *Int. J. Food. Microbiol.* 71: 177-188
- 27.- Girafa, G., Neviani, E., 2000. Molecular identification and characterization of food-associated *lactobacilli Ital.* *Journal Food Science* 12: 403-423.
- 28.- González, Mejuto, R., Leyva Castillo V., and Dario de Medici., 2002. Métodos rápidos y modernos de diagnóstico microbiológico en alimentos. *Alimentaria* 335: 11-24
- 29.- González, D.O., Palacios, N., Gallego, G., y Tohme, J., 1995. Protocolos para marcadores moleculares. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. Cali, Colombia. p. 36-40.
- 30.- Gouli, Z., Mingguang, Z., Zhijang, Z., Hongsheng, O. and Qiang, L., 1999. Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Science* 51:233-236

-
- 31.- Hall George M., 2001. Tecnología del procesado de pescado. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- 32.- Hecht Sidney M., 1996. Biorganic Chemistry: Nucleic acid. Oxford University Press.
- 33.- Hunt Della J., Parkes Helen C., & Lumley Ian D., 1997. Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleótido probes. *Food Chemistry* 60(3): 437-442.
- 34.- Jayarao, B.M., Gillespie, B.E., Oliver, S.P., 1996. Application of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for species identification of bacteria isolated from bovine milk. *J. Food Prot* 59: 615-620
- 35.- Knut Rudi., Hege, K.Nogva., Birgitte Moen., Hilde Nissen., Sylvia Bredholt., Trond Moretro., Kristine Naterstad., Askild Holck., 2002. Development and application of new nucleic acid-based technologies for microbial community analyses in foods. *International Journal of Food Microbiology* 78: 171-180.
- 36.- Koh, M.C., Lim, C.H., Chua, S.B., 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of read meat animal Species. *Meat Science* 48: 275-285.
- 37.- Konrad, J., Doming., Helmut, K., Mayer., Wolfgang Kneifel., 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus spp.* 2. Pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology* 88: 165-188
- 38.- Lahiff, S., Glennon, M., Brien, L.O., Lyng, J., Smith, T., Mather, M., and Shilton, N., 2000. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes* 15: 27-35.
- 39.- Laureti, E., 1996. Fish and fishery products. World apparent consumption statics based on food balance sheet (1961-1993). *FAO Fisheries Circular* No. 821. Rome, Italy: FAO.
- 40.- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., Anklam, E., Borchers, T., Braunschweiger, G., Busch, U., Eklund, E., Eriksen, F.D., Fagan, J., Felliinger, A., Gaugitsch, H., Hayes, D., Hertel, C., Hortner, H., Joudrier, P., Kruse, L., Meyer, R., Muller, W., Phillipp, P., Popping, B., Rentsch, R., Wurtz, A., et al., 1999. IUPAC collaborative tria study of a method to detect genetically modified soy bean and maize in dried powder. *J. AOAC* 82: 923-928.

-
- 41.- Lockley, A. K., and Bardsley, R. G., 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* 11: 67-77.
- 42.- Louie, M., Jayaratne, P., Luchsinger, I., Devenish, J., Yao, J., Schlech, W., & Simor, A. 1996. Comparison of ribotyping arbitrary primer PCR and pulse-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocitogenes*. *Journal Clinical Microbiology* 34:15-19
- 43.- Macedo, A., Barbosa, S. F. C., Alkmiri M. G. A., Vaz A. J., Shimokomaki M. 2000 Hamburger meat identification by dot-ELISA.
- 44.- Magnuson Jessica., Orth Michael., Lestienne, and Jan-Willem Taanman., 2003. Replication of mitochondrial DNA occurs throughout the mitochondria of cultured human cells. *Experimental Cell Research* 289: 133-142.
- 45.- Macki, I.M., 1996. Authenticity of fish. Food Authentication. Ed. Ashurt Dnnis. Pg. 140-470
- 46.- Mackie, I.M., Pryde, S.E., Gonzáles-Sotelo, C., Medina I., Pérez-Martín, R., Quinteiro J., Rey-Mendez, M., Rebién, H., 1999. Challenges in the identification of species of Cannes fish. *Trenes Food Sci. Technol* 10: 9-14
- 47.- Mannu, L., Paba, A., Pes, M., Floris, R., Scintu, M.F., Morelli, L., 1999. Strain typing among enterococci isolated from home-made porcine sardo cheese. *Microbiol. Lett.* 170: 25-30
- 48.- Margineantu, D.H., Cox, W. G., Sundell, L., Sherwood, S. W., Beechem, J.M., Capaldi R.A., 2002. Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* 1: 425-435
- 49.- Martínez, I., & YmanM, I., 1998. Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Research International* 31: 459-466
- 50.- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., 1999. A quick and Simple Method for the identification of meat Species and meat products by PCR assay. *Meat Science.* 51:143-148
- 51.- McPherson., Quirke, P., Taylor, G.R., 1991. PCR: A practical Approach. IRL PRESS. New, York. Pp. 1-13
- 52.- Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes.* 2a ed., P.W. Hochachka y T.P. Mommsen. Pp. 1-38

-
- 53.- Meyer, R., Hafelein, C., Lüthy, J., Candrian, U., 1995. Polymerase Chain Reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International* 78: 1542-1551
- 54.- Meyer, R., and Canadian, U., 1996. PCR-Based DNA Analysis for the identification and characterization of food components. *Academic Press Limited* 1-9
- 55.- Michael, A., Innis Gelfard David, H., Snisky John, J., 1999. PCR: applications protocols for functional genomics. *Academic PRESS*. New York. Pp. 127-131
- 56.- Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncalés, P., López-Pérez and Pérez-Martos, A., 2000. Direct and Highly Species-Specific detection of Pork Meat and Fat in Meat Products by PCR-amplification of Mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2829-2832.
- 57.- Myers, M.J., Nancy, H.F., & Farrell, D.E., 2003. Characterization of a polymerase chain reaction-based approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed. *Journal of Food Protein* 66: 1085-1089
- 58.- Narváez, R., Claudio Valenzuela, B., Jorge Muñoz, S.C.H., Carlos et al., 2000. Comparación de RAPD Y AFLP como métodos de identificación genética de vid basados en el estudio de fragmentos genómicos anónimos. *Agríc. Téc.*60 (4): 320-340.
- 59.- Nelson David, L., 2000. Lehninger Principios de Bioquímica. 3a Edición. Omega. Pp. 351-354
- 60.- Niederer, M., & Bolhalder, R., 2001. Identification of species specific central nervous tissue by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) a possible method for supervision of meat products and cosmetics. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung and Hygiene* 92: 133-144
- 61.- Palapa, V.A., Aimi, T., Inatomi, S., and Morinaga, T., 2002. ITS-PCR-RFLP Method for distinguishing commercial cultivars of Edible Mushroom, *Flammulina velutipes*. *Journal of Food Science* 67 (7): 2486-2490.
- 62.- Partis Lina and Wells Robert, J., 1996. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes* 10: 435-441.
- 63.- PCR Identification of black caviar. 1996. *Nature* 381(6579)
- 64.- Perry Johnson-Green., 2002. Introduction to food Biotechnology. CRC PRESS. E.U. Pp 59-64

- 65.- Popping Bert., 2002. The application of biotechnological methods in authenticity testing. *Journal of Biotechnology* 98: 107-112
- 66.- Puertas, M. J., 1992. Métodos de estudio del DNA. Genética: fundamentos y perspectivas. Ed. Interamericana. McGraw Hill. Pp. 315-345
- 67.- Quinteiro, J., Sotelo, C.G., Rehbein, H., Pryde, S.E., Medina, L., Perez-Martín, R.J., Rey-Mendey, M., & Mackie, I.M., 1998. The use of mtDNA direct PCR-sequencing and PCR-RFLP methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1662-1669.
- 68.- Ram, J.L., Ram, M.L., and Baidun, F., 1996. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *Journal Agricultural Food Chemistry* 44: 2460-2467.
- 69.- Rehbein Hartmut., Mackie Ian, M., Pryde Susan., Carmen Gonzáles-Sotelo., Medina Isabel., Ricardo Pérez-Martín., Quinteiro Javier., Manuel Rey-Méndez., 1999. Fish species identification in Canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chemistry* 64: 263-268.
- 70.- Rehbein Hartmut., Mackie Ian, M., Pryde Susan., Carmen Gonzáles-Sotelo., Pérez-Martín., Quinteiro Javier., Manuel Rey-Méndez., 1995. Fish species identification in Canned tuna by DNA analysis (PCR-SSCP). *Informationen für die Fischwirtschaft* 42: 209-212
- 71.- Rigaa, A., Cellos, D., Monnerot, M., 1997. Mitochondrial DNA from the scallop *Pecten maximus*: an unusual polymorphism detected by restriction fragment length polymorphism analysis. *Heredity* 79 (4): 380-387
- 72.- Roushdy, I.M., Ehrmann, M.A., Vog, R.F., 1998. Molecular identification and characterization of halo-tolerant lactic acid bacteria isolated from soft pickled "Domiate" cheese. *Adv. Food. Sci.* 20: 40-45
- 73.- Rudi, K., Skulberg, O. M., Skulberg, R., Jakobsen, K. J., 2000. Application of sequence-specific labeled 16S rRNA gene nucleotide probes for genetic profiling of cyanobacterial abundance and diversity by array hybridization. *App. Environ. Microbiol* 66: 4004-4011
- 74.- Russell, V.J., Hold, G.L., Pryde, S.E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Rey Méndez, M., Sotelo, C.G., Ricardo, I., Pérez-Martín., Santos, A.T and Rosa, C., 2000. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between Salmon species. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2184-2188.

-
- 75.- Saavedra, C., Reyero, M., Zorros, E., 1997. Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* 145: 1073-1082
- 76.- Saez, R., Sanz, Y., Taldrá, F., 2004. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science* 66: 659-665.
- 77.- Sajedi, R.H., Aminzadeh, S.H., Nader-Manesh., Sadeghizadeh, M., Abdolhay, H., and Naderi-Manesh., 2003. Genetic Variation Within and among Rainbow Trout, *Onchorhynchus mykiss*, Hatchery Populations from Iran Assessed by PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA Segments. *Journal of food Science* 68(3): 870-873
- 78.- Sambrook, J., Russel, D., 2000. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 79.- Sanjuan, A.J., Raposo-Gillan and Comesaña, A.S., 2002. Genetic Identification of *Lophius budegassa* and *L.piscatorius* by PCR-RFLP Analysis of a Mitochondrial Trna^{Glu}/Cytocrome b Segment. *Journal of food Science* 67(7): 2644-2648.
- 80.- Scarpied, H.J., Kvaal, K., & Hildrum, K.I., 1998. Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectrofocusing protein profiles. *Electrophoresis* 19: 3103-3109
- 81.- Smith, D.M., 1995. Immunoassays in process control and speciation of meats. *Food Technology*, febrero, 120-128
- 82.- Sotelo, C., Piñero, C., Gallardo, J.M., Pérez-Martín, R., 1993. Fish species identification in seafood products. *Trenes in food Science and Technology* 4: 395-401
- 83.- Stoneking, M., Soodyall, H., 1996. Human evolution and the mitochondrial genome. *Curr. Opin. Genet. Dev* 6: 731-736
- 84.- Stryer Lubert., 1995. Bioquímica. Tomo II. 4ª edición. Reverté, S.A. España. Pp.988- 989.
- 85.- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Gueron, M.E., Adrighetto, C., Lanorte, M.T., 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (Semicotto caprino). *J. Appl. Microbiol.* 89: 267-274
- 86.- Taanman, J.W., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta.* 1410: 103-123

-
- 87.- Thomas, P., 2000. History of escargot as a food source. *National value*. Available from: <http://www.escargot.fre.fr>
- 88.- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438.
- 89.- Venkatesh, B., Brenner, S., 1997. Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene, a comparative analysis of teleost growth hormone gene. *Gene* 187: 211-215
- 90.- Vigilant., Stoneking, M., Harpending, H., Hawkes, K., Wilson, A.C., 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253: 1503-1507
- 91.- Wissiack, B., de la Calle, G., Bordin., 2002. Screening test to detect meat adulteration through the determination of hemoglobin by action exchange chromatography with diode array detection. *Meat Science* .427-432
- 92.- Wolf, C., and Luthy, J., 2000. Quantitative competitive (QC) PCR for Quantification of porcine DNA. *Laboraty of food chemistry*.
- 93.- Wolf, C., Rentsch, J., and Hubener, P. 1999. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Reliable Method for Species Identification. *J. Agric. Food Chem* 47:1350-1355.
- 94.- Wolf Christian., Hubner Philipp., Lüthy Jürg., 1999. Differentiation of sturgeon species by PCR-RFLP. *Food Research International* 32: 699-705.
- 95.- Yoshizaki, G., Yamaguchi, K., Oata, T., Strossmann, G.A., Takashima, F., 1997. Cloning and characterization of pejerrey mitochondrial DNA and its application for RFLP analysis. *J. Fish. Biol.* 51 (1): 193-203
- 96.- <http://www.danubio.com/salmon.html>
- 97.- <http://eos.cnice.med.es>
- 98.- <http://Sol.biol.unlp.edu.ar/embnet/secuenciacion/purificaci3n.html>
- 99.- <http://usinfo.state.gov/journals/ites/0502/ijes/label.htm>
- 100.- <http://webcd.usal.es/web/transgen00/Unidades/documen01/caballero/cap7.htm>
- 101.- <http://www.ciencias.uma.es>
- 102.- http://www.vi-e.cl/internas/aprende/lo_mejor/hombre_america.htm
- 103.- <http://143.107.183.180/~ecuadros/MA096/>
- 104.- www.azti.es/castellano/Agrobol/bolAgro7.htm
- 105.- www.es.embnet.org/Doc/ECT-1998-04/primer/index.es.html-8k
- 106.- www.fao.org

-
- 107.- www.geocities.com
 - 108.- www.ilm.pf/pcr.htm
 - 109.- www.lab314.com
 - 110.- www.labroe.com
 - 111.- www.mitocondrial.com
 - 112.- www.nutrar.com
 - 113.- www.pedramol.com
 - 114.- www.sanostra.es/homewebnst
 - 115.- www.sistemasgenomicos.com
 - 116.- www.terralia.com/revista12/pagina43.htm
 - 117.- www.ucm.es/info/otri/complutecno/fichas/tec_martinsantos1.htm