



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

AUTENTIFICACION DE ESPECIES DE SALMON EN
PRODUCTOS COMERCIALES AMPLIFICANDO REGIONES
ESPECIFICAS DEL DNA MITOCONDRIAL, POR MEDIO DE LA
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

GINA BENITEZ ESQUIVEL

ASESORES: DR. JOSE FRANCISCO MONTIEL SOSA

DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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:

Autenticación de especies de salmón en productos comerciales
amplificando regiones específicas del DNA mitocondrial, por
medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

que presenta la pasante: Gina Benítez Esquivel
con número de cuenta: 9606883-0 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.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 7 de Julio de 2004

PRESIDENTE	<u>Dr. José Francisco Montiel Sosa</u>	
VOCAL	<u>MC. Carolina Moreno Ramos</u>	
SECRETARIO	<u>IA. María Guadalupe López Franco</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. María de la Luz Zambrano Zaragoza</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>IA. Miriam Alvarez Velasco</u>	

*No hacen falta alas para hacer un sueño
basta con las manos
basta con el pecho
basta con las piedras
y con el empeño.*

*No hacen falta alas para ser más bellos
basta el buen sentido del amor inmenso.*

No hacen falta alas para alzar el vuelo.

Silvio Rodríguez

Dedico con cariño este trabajo a todos aquellos quienes han sido parte fundamental de mi desarrollo y formación. Reconocidamente quiero mencionar a mi familia, como un agradecimiento a su apoyo incondicional, a quienes me han acompañado en este camino y me empujaron a llegar hasta aquí y nunca estancarme. A *mis padres* por compartir conmigo las alegrías y los desvelos, por guiarme y darme las herramientas con las que he logrado ser quien soy, pero especialmente por permitirme llegar hasta aquí. A mis hermanos por acompañarme en este largo camino, en especial a *Nan*, por ser tan genial, por todas sus enseñanzas, por ser el ejemplo más importante de integridad, por siempre estar al pendiente de mí e invitarme a ser feliz. A *Isra* por ser la persona más admirable con el carácter más lindo y por ser quien me estimuló a formarme en el área de la ciencia y la tecnología. A los dos por ser los mejores maestros que he tenido. A *Rach* por ser una excelente amiga, por escucharme y cuidarme siempre como una segunda madre y a *Jair* por ser tan carismático y servicial, aún cuando no lo hemos compartido mucho. A todos por ser las mejores personas del mundo.

De un modo muy especial dedico este trabajo y este logro a *Rober* por enseñarme que el futuro puede ser como yo lo desee y por invitarme a formar parte del suyo, pero sobre todo por sus palabras de aliento, su paciencia, sus cuidados y por no dejarme caer aún en los momentos más difíciles.

A *Liz y Panda* por compartir este esfuerzo desde el principio y hacerlo agradable, por lo que ahora son mis mejores amigos y una segunda familia para mí.

A *Paty* (dra.) por su confianza, su apoyo y sus consejos. Por ser tan buena amiga y preocuparse por mí no sólo como alumna sino también como persona. Al doc *Paco* por compartir esta aventura conmigo. A ambos por apoyarme en los momentos más duros y no dejarme sola.

A *Milet* por ser una gran amiga y ejemplo de alegría e integridad y por lo mucho que me hizo falta estos años.

A *Miguel, Yare, Lobo, Yorch, Toño* (chub), *Viri, Serv*, y al resto de la banda de la FES-C, por los geniales ratos que pasamos y de quienes aprendí mucho todos estos años. Salud!

A mis profesores favoritos, *Laura Cortazar y Saturnino Maya* con quienes compartí momentos muy agradables y a quienes he llegado a admirar mucho.

Gina

Agradecimientos

Ninguna obra es posible por una sola persona, por ello agradezco a todos aquellos que en algo hicieron posible esta tesis.

Al Dr. Francisco Montiel y la Dra. Patricia Miranda por su dirección y sus valiosas asesorías, por escuchar mis razonamientos y respetar mi propio método y mis hipótesis para llevar a cabo este trabajo. Por compartir la información disponible conmigo y motivarme para llegar más lejos de lo que creíamos posible.

En el aspecto técnico agradezco la valiosa participación de M. en C. Esperanza García por su tiempo y empeño en la adaptación de la técnica para la extracción del DNA de tejidos animales. Además agradezco al laboratorio de análisis y química de secuenciación de ADN de la FES Iztacala, especialmente al Biólogo Alejandro Monsalvo Reyes, por su servicio en la secuenciación del DNA amplificado. Así mismo agradezco a José Luis Nava por su asesoría y soporte en la obtención de las muestras experimentales.

Por su aporte en la parte experimental quiero nombrar a Roberto Martínez quien me brindó su auxilio y su apoyo económico y material. A Ruth Delgado por su soporte teórico y su agradable compañía, especialmente por escuchar mis inquietudes y ayudarme a resolver los tropiezos experimentales. Del mismo modo agradezco a I.A. Elizabeth Leyva por brindarme su ayuda en este aspecto y por regalarme su grata compañía.

En la observación de este documento agradezco a Lic. Nancy Benítez por su revisión detallada de los primeros capítulos, por sus valiosas aportaciones y por su apoyo en la impresión del documento final. Así mismo agradezco a M. en C. Carolina Moreno, I.A. Guadalupe López, M. en C. Ma. de la Luz Zambrano y I.A. Miriam Álvarez por sus importantes comentarios para ampliar la calidad de este trabajo.

Al Lic. Gerardo Fernández por su aportación económica para la realización del trabajo experimental.

Finalmente agradezco a I.A. Edgar Ruiz y Javier por amenizar mis sesiones de trabajo.

Índice

Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
Presentación del trabajo	vi
Resumen	vii
Terminología	viii
Introducción	1
Capítulo 1. El salmón en México	6
1.1 Generalidades de la familia de los salmónidos	6
1.1.1 Salmónidos del Atlántico	6
1.1.2 Salmónidos del Pacífico	8
1.2 Valor nutritivo y calidad del salmón	11
1.3 Tecnología y procesado del salmón	14
1.3.1 Salmón ahumado	14
1.3.1.1 Descripción del proceso	15
1.3.1.1 Normatividad	18
1.3.2 Salmón enlatado	19
1.4 Importación y exportación de salmones y truchas	23
CAPITULO 2. Aplicaciones biotecnológicas en la autenticación de alimentos. La PCR	25
2.1 Métodos para autenticación de alimentos	25
2.1.1 Análisis de proteínas	25
2.1.2 Análisis de DNA	27
2.1.2.1 Hibridación de DNA	28
2.1.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
2.2 Descripción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
2.2.1 Fundamento de la PCR	30
2.2.2 Etapas de la reacción	30
2.2.2.1 Desnaturalización	30
2.2.2.2 Hibridación	32
2.2.2.3 Elongación (extensión, replicación o polimerización)	33
2.2.3 Componentes de la reacción	35
2.2.3.1 Oligonucleótidos	35

2.2.3.2 DNA polimerasa termoestable	37
2.2.3.3 Desoxynucleosidos trifosfatos (dNTPs) en exceso	37
2.2.3.4 Cationes divalentes	37
2.2.3.5 DNA diana	38
2.2.4 Análisis del producto de la PCR	38
2.2.4.1 <i>Primers</i> específicos de las especies	39
2.2.4.2 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	40
2.2.4.3 Secuenciación de los productos de PCR	40
2.2.4.4 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)	41
2.2.4.5 SSCP (Single strand conformational polymorphism)	44
CAPÍTULO 3. Metodología experimental	46
3.1 Cuadro metodológico	46
3.1.1 Descripción del cuadro metodológico	46
3.1.1.1 Actividad preliminar	46
3.1.1.2 Objetivo particular 1	48
3.1.1.3 Objetivo particular 2	48
3.1.1.4 Objetivo particular 3	49
3.1.1.5 Objetivo particular 4	49
3.1.1.6 Objetivo particular 5	50
3.2 Materiales	51
3.2.1 Material biológico	51
3.2.2 Reactivos y productos biológicos	52
3.2.3 Equipo utilizado	53
3.3 Métodos	54
3.3.1 Extracción de DNA total a partir de tejido muscular	54
3.3.2 Cuantificación de DNA por medición de absorbancia a 260 nm	55
3.3.3 Amplificación de DNA	57
3.3.3.1 Preparación de la reacción	57
3.3.3.2 Etapas y ciclos de la reacción	57
3.3.4 Análisis de productos	58
3.3.4.1 Preparación del gel de agarosa	58
3.3.4.2 Electroforesis horizontal (carga y corrida del gel)	60
3.3.4.3 Fotografías de los geles	61
3.3.5 Purificación de DNA	62
3.3.6 Secuenciación de DNA	62
3.3.7 Diseño de RFLP	63
Capítulo 4. Resultados y discusión	64
4.1 Diseño y selección de primers	64
4.2 Evaluación experimental de los primers	68
4.2.1 Grupo 1. Especies filogenéticamente distantes	68
4.2.2 Grupo 2. Especies de pescado filogenéticamente distantes	69

4.2.3 Grupo 3. Especies filogenéticamente cercanas. Identificación de especies de la misma familia	71
4.2.4 Grupo 4. Salmones	72
4.3 Evaluación de la capacidad de los primers para amplificar salmón procesado térmicamente	75
4.4 Planteamiento del protocolo de autenticación	77
4.5 Autenticación de productos de salmón	78
4.6 Desarrollo del protocolo para RFLP	79
4.6.1 Secuenciación automática	80
4.6.2 Análisis de sitios de restricción	82
Conclusiones	86
Referencias consultadas	89
Anexo1: Electroferogramas de la secuenciación automática	93

Índice de figuras

Figura 1.1 Salmónidos del Atlántico	7
Figura 1.2 Salmónidos del Pacífico	9
Figura 1.3 Diagrama del proceso para la obtención de salmón ahumado	16
Figura 1.4 Diagrama del proceso de esterilización de salmón en latas	21
Figura 1.5 Producción de trucha arco iris y salmón en México	23
Figura 1.6 Importación y exportación de pescado fresco y procesado en México para el año 2001 (productos específicos)	24
Figura 2.1 Representación del mecanismo de la PCR	31
Figura 2.2 DNA resultante en el transcurso de los ciclos	34
Figura 2.3 Análisis electroforético para productos de PCR que utilizaron <i>primers</i> específicos	40
Figura 2.4 Perfil electroforético de un gel con muestras digeridas utilizando enzimas de restricción	43
Figura 3.1 Cuadro metodológico	47
Figura 3.2 Esquematzación del programa utilizado en el termociclador	58
Figura 3.3 Fotografía de geles por iluminación UV	61
Figura 4.1 Genoma mitocondrial del salmón rey <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	65
Figura 4.2 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con muestras de DNA de especies filogenéticamente lejanas	68
Figura 4.3 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con DNA de especies que pertenecen a otras familias de peces	70
Figura 4.4 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con DNA de especies filogenéticamente cercanas	72
Figura 4.5 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con DNA procedente de salmones	73
Figura 4.6 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con DNA de salmón del Atlántico	75
Figura 4.7 Electroforesis en gel de agarosa al 2% Productos de PCR con DNA de salmón del Atlántico procesado a diferentes temperaturas	76
Figura 4.8 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con DNA de productos de salmón	78
Figura 4.9 Electroferograma de la secuenciación automática. Fragmento correspondiente a la selección para trucha arco iris	82
Figura 4.10 Electroferograma de la secuenciación automática. Fragmento correspondiente a la selección para salmón del Atlántico	82
Figura 4.11 Mapas de restricción para ambas secuencias, región de 72 pb	83
Figura 4.12 Mapas de restricción para enzimas de interés, región amplificada completa	84
Figura 4.13 Perfil electroforético del RFLP planteado con MseI para muestras de salmón del Atlántico y trucha arco iris	85

Índice de tablas

Tabla 1.1 Principales componentes químicos en diferentes pescados	11
Tabla 1.2 Valores teóricos de calidad proteica de la carne cruda de diversos grupos de pescados	11
Tabla 1.3 Tabla comparativa de la composición química de truchas y salmones	12
Tabla 2.1 Diseño de <i>primers</i> : propiedades de los oligonucleótidos que influyen la eficiencia de amplificación	36
Tabla 2.2 Secuencias de reconocimiento de algunas enzimas de restricción	41
Tabla 3.1 Componentes de la PCR, preparación de los ensayos	57
Tabla 3.2 Componentes de un gel de agarosa para electroforesis	59
Tabla 3.3 Volumen de los componentes utilizados en la electroforesis	60
Tabla 4.1 Selección y diseño de <i>primers</i>	65
Tabla 4.2 Características de los <i>primers</i> diseñados para autenticar productos de salmón	77

Presentación del trabajo

La presente tesis es un trabajo experimental que consta de dos partes fundamentales, la primera corresponde a la parte teórica que da sustento a la experimentación y a los resultados obtenidos y, la segunda es la parte experimental en la que se detalla el modo en que ha sido realizada la experimentación (capítulo 3) y los alcances que se tuvieron tras su realización (capítulo 4).

La parte teórica, a su vez, se ha dividido en dos partes para dar mejor consistencia al texto. En el primer capítulo se describen los salmones (incluyendo otros pescados) desde el punto de vista biológico, nutricional, tecnológico y económico con el fin de presentar en forma detallada la razón por la que se utilizó al salmón como objeto de identificación. El capítulo 2 resume el fundamento del método primordial utilizado en este trabajo, la reacción en cadena de la polimerasa, en comparación con otros métodos análogos de análisis e incluso con métodos complementarios. Este capítulo tiene el propósito de fundamentar la razón por la cual el análisis realizado en este trabajo, es el adecuado para la autenticación de alimentos.

Por otra parte, para la mayor comprensión del planteamiento de este trabajo se ha incluido un apartado introductorio que explica la justificación y los antecedentes del trabajo realizado. Así mismo, también se ha apuntado una sección que reúne los términos técnicos más utilizados en el texto.

Resumen

El presente trabajo muestra los resultados obtenidos de la aplicación experimental de un método recientemente utilizado en la autenticación de alimentos, conocido como la Reacción en Cadena de la Polimerasa o *Polymerase Chain Reaction* (PCR). El método se ha probado para la identificación de especies enmascaradas bajo productos de salmón ahumado y enlatado, y se ha probado sobre diversas especies extrañas, lo que ayudó a constatar que los resultados son congruentes con el objetivo planteado.

Así pues, este trabajo implicó el diseño de *primers* especie-específicos y el planteamiento de un protocolo para RFLP, con el que pudieran diferenciarse especies filogenéticamente cercanas que, por razones económicas y biológicas, pudieran ser utilizadas bajo el nombre de salmones procesados.

Terminología

- **Adulteración:** Falsificación
- **Amplificado:** Producto resultante de la PCR. Fragmentos específicos de DNA dúplex multiplicados durante la reacción.
- **Annealing:** Apareamiento, *base-pairing*. Asociación de hebras simples complementarias de DNA para formar una doble hélice.
- **Autenticar:** Reconocer como auténtico a algo. Actualmente se puede utilizar el término autenticar indiscriminadamente.
- **BrEt:** Bromuro de etidio
- **DNA diana:** DNA molde, plantilla, *template*, *target*. Fragmento al que se dirige la PCR, delimitado por los *primers*.
- **Elongación:** Extensión, replicación, polimerización: Etapa de la PCR en la que la DNA polimerasa amplifica al DNA diana a partir de los *primers*.
- **Mapa de restricción:** Representación de la posición de los sitios reconocidos por diversas enzimas de restricción en la secuencia de DNA analizado.
- **Nt:** Nucleótido(s).
- **Pb:** Pares de bases.
- **PCR:** Polymerase Chain Reaction. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Amplificación Génica.
- **Primer:** Cebador, oligonucleótido. Secuencia corta de DNA de cadena simple, que apareada a una hebra de DNA molde puede ser elongada en su extremo 3' por una DNA polimerasa.
- **RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism. Polimorfismos de restricción de DNA.
- **Sitio de restricción:** Término que describe, en una molécula de DNA, el sitio de acción de una enzima de restricción.
- **Tm:** *Melting Temperature*. Temperatura de fusión.
- **Variabilidad inter específica:** Variaciones que presentan las secuencias genómicas de las especies de una familia con especies de otra familias.
- **Variabilidad intra específica:** Variaciones que presentan las secuencias genómicas dentro de una misma familia.

Introducción

La identificación de especies de pescados puede ser incierta siempre que las características usuales como forma, tamaño y apariencia sean modificadas en el procesamiento, y sólo una porción de músculo esté disponible, lo que implica que las especies puedan verse idénticas. De ahí proviene el problema de la identificación de especies, sobre todo en aquellas de importancia comercial.

Las características morfológicas son por sí mismas un reflejo de las diferencias genéticas, por ello las técnicas analíticas que pueden revelar las diferencias genéticas a escala molecular serán más significativas en la identificación de especies.

El salmón es una especie importante en el aspecto gastronómico y comercial. En consecuencia existe mucho interés en la estructura genética de salmón con respecto a su identificación, manejo y conservación.

El salmón que se comercializa en México principalmente es en fresco, aunque también se comercializa enlatado y ahumado, éste último habitualmente envasado al vacío, sin embargo el salmón procesado no se comercializa ampliamente en nuestro país, principalmente debido a que no se produce en México por las condiciones climáticas que nuestro país manifiesta, y si es así, su producción es estrictamente baja. Los principales productores de salmón son países de clima frío, lo que implica que la importación procedente de Chile, España y Canadá sea la principal fuente de comercialización de salmón (sobre todo procesado), de acuerdo con las estadísticas presentadas por la FAO en el año 2003. Tal circunstancia se refleja en altos costos de venta debido a la escasez de los productos, a su alto valor nutritivo y, sobre todo, a la importancia en la rama gastronómica pues se sabe de la exquisitez que puede ofrecerse en los productos asociados al salmón, como lo señala E. Rehbronn (1989).

El pescado con mayor semejanza al salmón que sí es cultivado en nuestro país es la trucha, principalmente trucha arco iris, aunque también es posible conseguir trucha asalmonada, la cual manifiesta gran parecido con el salmón por el color rojo-naranja de sus tejidos, sin embargo el color es adquirido en los criaderos debido al tipo de alimentación que se les suministra. B. Popping, e I. M. Mackie advierten que es común encontrar a la trucha arco iris enmascarada como una especie más cara –tal vez más que la trucha asalmonada–, puesto que cuando se cultiva en el mar suele desarrollar una apariencia plateada que anima a los vendedores a sustituirla por salmón. Así pues, esta última ha podido ser utilizada para elaborar salmón ahumado, que comúnmente debería ser salmón del Atlántico, contrariamente a lo que declara la norma NMX-497-1994-SCFI; I. M. Mackie indica en este caso que debido al aspecto similar de todo el salmón ahumado, los salmones del Pacífico también pueden encontrarse como sustitutos del salmón del Atlántico *Salmo salar*, que es el principal pilar de la acuicultura europea y sudamericana.

Así pues, este tipo de pescados pueden ser ofrecidos en lugar de salmón y a mayor costo de su valor real lo que constituye un fraude, especialmente si el pescado carece de sus características morfológicas originales y si las características que presenta en el procesado pueden formar parte de los cambios que le confiere el procesamiento, según expone W.F.A. Horner (2001); ambos casos dificultan al consumidor detectar la originalidad del producto y su autenticidad.

La falsificación del salmón y sus productos es muy común, además de lo ya expuesto, debido a la alta ganancia resultante de la escasa venta de dicha especie (puesto que es costosa). El alto costo del salmón puede llevar a las empresas emparadoras y/o productoras a ofrecer otras especies de pescados con características organolépticas parecidas al salmón (como ya se ha mencionado para las truchas) pero que disminuyen su costo, obteniendo así un mayor volumen de ventas con una menor inversión. En conclusión: ganancias para la empresa a través de adulteraciones en los productos, lo que representa un fraude al consumidor.

La necesidad de identificar las especies que se involucran en los productos de salmón nació tras la aparición de fraudes, como se comenta arriba. Sin embargo, la diferenciación de especies relacionadas inter específicamente se complica pues presentan patrones proteicos sumamente parecidos.

Los métodos actualmente disponibles para la diferenciación de especies consisten principalmente en el análisis de proteínas por electroforesis, enfoque isoelectrónico en geles de poliacrilamida, métodos inmunológicos y en técnicas basadas en la identificación de DNA (hibridación de DNA y PCR). A. K. Lockley (2000) ha señalado que, a excepción de los métodos basados en el DNA de las especies, los métodos mencionados han tenido una serie de problemas, especialmente en la identificación de productos que han sido procesados utilizando calor o que contienen complejas mezclas de especies. Estos problemas pueden resolverse con las técnicas basadas en DNA, que detectan la presencia de especies específicas mediante el ácido desoxirribonucleico (DNA) en los productos alimenticios.

Particularmente, la reacción en cadena de la polimerasa tiene un alto potencial para la identificación de especies debido a su creciente sensibilidad y especificidad cuando se compara con los ensayos de proteínas e hibridación con DNA. R. Meyer (1996) determinó las ventajas que presenta el análisis del DNA, entre las que se enumeran: a) la ubicuidad del DNA (pues todas las células de los individuos presentan la información genética idéntica); b) la información que contiene el DNA, que es más alta comparada con las proteínas; y c) el DNA es una molécula mucho más estable, y es posible su extracción a partir de diferentes tipos de muestras.

El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la identificación de productos aún cuando han sido sometidos a un duro procesamiento, lo que implica un alto potencial debido a su creciente sensibilidad y especificidad.

La especificidad de la reacción puede ser acrecentada especialmente cuando se complementa con análisis SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) que utiliza una sola cadena de DNA, en lugar de la doble cadena de DNA; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) que implica el uso de enzimas de

restricción para obtener la secuencia exacta de la especie de la que se desea identificar y verificar las diferencias entre otras especies.

La PCR fue utilizada en el presente trabajo para la identificación de fragmentos de DNA mitocondrial, cuya secuencia es auténtica y única para la especie en cuestión, además de que aún está presente en los tejidos del salmón procesado.

La amplificación de fragmentos específicos de DNA mitocondrial muestra una serie de ventajas sobre el DNA de cualquier otro organelo e incluso sobre el DNA nuclear, dichas ventajas han sido descritas por C. D. Hurst, Ladish, A. K. Lockley, I. M. Mackie, J. F. Montiel y C. Wolf, las que se conjuntan a continuación:

- ▮ El DNA mitocondrial es relativamente más abundante que el DNA nuclear.
- ▮ El DNA mitocondrial permite la discriminación entre especies cercanamente relacionadas debido a su alto grado de mutación, comparado con los genes nucleares y tiende a resultar en la acumulación de suficientes puntos de mutación.
- ▮ El DNA mitocondrial generalmente evoluciona mucho más rápido que el DNA nuclear.
- ▮ El DNA mitocondrial también exhibe un mayor grado de variabilidad intraespecífica, del cual existen bastantes copias dentro de la célula.
- ▮ El DNA mitocondrial es mucho más pequeño que el DNA nuclear puesto que está conformado por sólo 13 genes, mientras que el DNA nuclear conjunta de 30 000 a 40 000 genes, lo que lo hace más adecuado para su estudio.

La organización de los genes del DNA mitocondrial además, es conocida, tanto como la disposición de secuencias reportadas para muchas especies, lo que hace posible un fácil diseño de *primers* específicos para la amplificación.

Así bien, como ya se ha mencionado, el método basado en PCR es ampliamente ventajoso sobre una gran cantidad de métodos analíticos, ya sea por sus costos o por el tiempo reducido que requiere para llevarse a cabo, pero sobre todo por la

alta fidelidad y rendimiento, especialmente si los *primers* se seleccionan y aplican adecuadamente. El resultado del estudio presentado no sólo consistió en analizar muestras e identificar adulteraciones, sino también implicó el desarrollo de un protocolo más simple y específico para el análisis de los productos procesados de salmón, considerablemente confiable y a menor costo, y que puede ser adoptado por la industria de alimentos como herramienta de control de calidad o incluso para auditar a proveedores y productores de salmón procesado.

Capítulo 1. El salmón en México

1.1 GENERALIDADES DE LA FAMILIA DE LOS SALMÓNIDOS

La ubicación sistemática de los salmones es [48]:

- ▮ Clase: Osteichthyes
- ▮ Subclase: Actinopterygii
- ▮ Superorden: Protacanthopterygii
- ▮ Orden: Salmoniformes
- ▮ Suborden: Salmonoidei
- ▮ Familia: Salmonidae

Dentro de la familia salmonidae existen dos géneros: el género *Salmo* que corresponde a los salmones del Atlántico, y el *Parasalmo* (ahora *Oncorhynchus spp.*) al que pertenecen los salmones y las truchas del Pacífico. Todas las especies pertenecientes a la familia Salmonidae son exclusivas del hemisferio norte y no existían en el hemisferio sur antes de que el hombre las introdujera. [48]

Aunque existe una gran diversidad de especies dentro de esta familia, para el fin del presente trabajo se mencionan únicamente las más importantes. Tales especies se clasifican en dos grupos, los pertenecientes al Pacífico y los pertenecientes al Atlántico.

1.1.1 Salmónidos del Atlántico

En este género destaca el salmón del atlántico *Salmo salar*, sin embargo, la mayoría de las especies existentes de truchas pertenecen a este grupo.



a) Salmón del Atlántico
(*Salmo salar*)



b) Trucha Asalmonada
(*Salmo trutta morpha fario*)



c) Salvelino (*Salvelinus fontinalis*)



d) Trucha alpina
(*Salvelinus alpinus*)



e) Trucha lacustre
(*Salvelinus namaycush*)

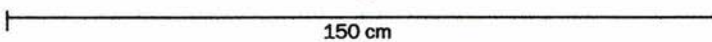


Figura 1.1 Salmónidos del Atlántico

El salmón del atlántico *Salmo salar* (figura 1.1,a) se distingue por su cabeza pequeña, pedúnculo caudal esbelto y aleta caudal con borde posterior cóncavo. Es una especie de gran talla que puede alcanzar 1 m de longitud y 20 Kg. de peso, y el color de sus tejidos es rojizo. Se reproduce en las zonas altas de los ríos en aguas muy frías y oxigenadas. [19, 46]

La trucha común, *Salmo trutta morpha fario* (figura 1.1,b) es, en cambio, una especie de talla media (menos de 60 cm de longitud), de coloración variable, normalmente con manchas negras y rojas. Su reproducción es en aguas muy frías (5-10°C) Esta especie es comúnmente conocida en México como trucha asalmonada por el color naranja de su músculo, aunque tiene alrededor de 70 denominaciones distintas alrededor de todo el mundo. [46]

El salvelino *Salvelinus fontinalis* (figura 1.1,c) se distingue por su jaspeado verde-negro en su espina dorsal y por los puntos rojos con aureolas azules a los costados. Puede medir más de 80 centímetros y pesar aproximadamente 9 kg. Crece en temperaturas que varían desde los 0°C hasta los 26°C. [32]

La trucha alpina *Salvelinus alpinus* (figura 1.1,d) es una especie de gran tamaño, que puede medir hasta 107 cm. y pesar 15 Kg. Sus condiciones de cultivo son menos amplias que para el salvelino, variando de 4 a 16°C. Se distingue por la presencia de 23 a 32 branquias y puntos rosas-rojos en los costados. [44]

La trucha lacustre *Salvelinus namaycush* (figura 1.1,e) es una especie de mayor tamaño puesto que llega a medir hasta 150 cm y pesar 32.7 Kg. Se caracteriza por su color, manchas blancas o amarillentas en un fondo verde grisáceo. Hay una variación de colores en su piel, sin embargo, jamás se presenta el rosa o el rojo. [32]

1.1.2 Salmónidos del Pacífico

Son siete los salmones que conforman este grupo (género *Oncorhynchus* spp), aunque los más importantes a nivel comercial son sólo cinco: salmón real, salmón

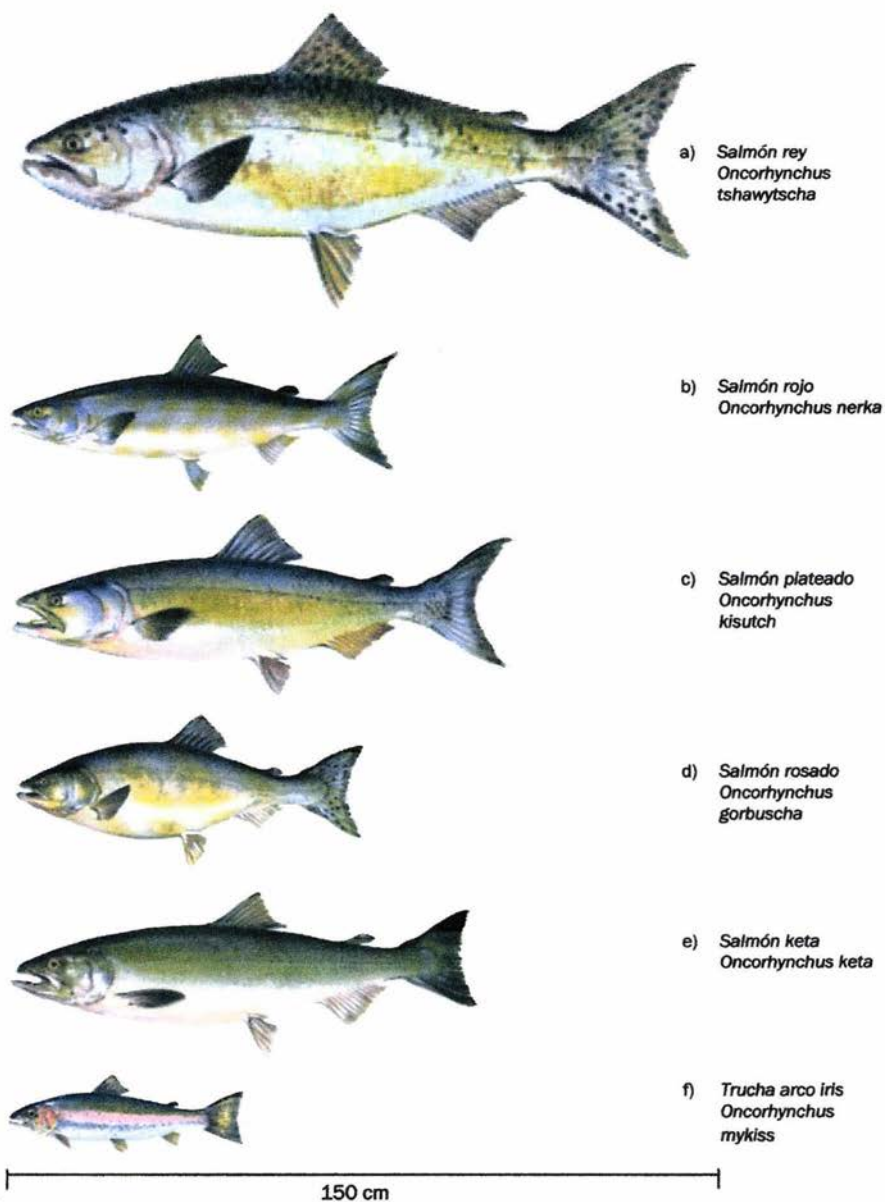


Figura 1.2 Salmónidos del Pacífico

rojo, salmón plateado, salmón rosa, salmón keta y, además, la trucha arco iris. [3, 52]

El salmón real, *Oncorhynchus tshawytscha* (figura 1.2,a), también es conocido como salmón chinook o salmón rey. Este es el más grande de los salmones, con un peso aproximado de 9 kg y 150 cm de longitud, su carne varía del color rojo intenso hasta el blanco. [32, 52]

El salmón rojo, *Oncorhynchus nerka* (figura 1.2,b), pesa 3 Kg en promedio y llega a medir aproximadamente 84 cm, su carne es de color anaranjado intenso. [32, 52]

El salmón plateado, *Oncorhynchus kisutch* (figura 1.2,c), también conocido como salmón coho, tiene un peso promedio de 2.7 kg y longitud de 108 cm. Su carne es de color rojo claro. [32, 52]

El salmón rosa, *Oncorhynchus gorbuscha* (figura 1.2,d), tiene la carne de color rosa claro y sabor delicado. Su peso medio es de 1.8 Kg y su longitud de 76 cm, por lo que es la especie de salmón menor tamaño. [19, 32, 52]

El salmón keta, *Oncorhynchus keta* (figura 1.2,e) también conocido en algunas zonas como salmón chum y/o salmón-perro, tiene un peso medio de 3.5 Kg y longitud de 100 cm. Su carne varía del color rosa intenso a casi blanco. [32, 52]

La trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (figura 1.2,f), hace no mucho tiempo conocida como *Salmo gairdneri* y antes *Salmo irideus*, es de talla media (menos de 50 cm de longitud). Es muy semejante a la trucha común pero con la cabeza más pequeña y con aletas moteadas con manchas negras. Presenta una banda lateral irisada que recorre todo el cuerpo. Esta especie es menos exigente que la trucha común y el resto de los salmones en lo referente a temperatura y oxígeno. [47, 48]

1.2 VALOR NUTRITIVO Y CALIDAD DEL SALMÓN

Los principales componentes químicos del pescado son agua, proteína bruta y lípidos, estos componentes tienen gran importancia cuando se refiere al valor nutritivo, propiedades texturales, calidad organoléptica y capacidad de almacenamiento de la carne. Los carbohidratos, vitaminas y minerales se encuentran presentes en menor cantidad, sin embargo desempeñan un importante papel en los procesos bioquímicos y el valor nutritivo de los productos pesqueros. La **tabla 1.1** presenta la composición de tres clases diferentes de pescados. [42]

TABLA 1.1 PRINCIPALES COMPONENTES QUÍMICOS EN DIFERENTES PESCADOS

ESPECIE	% PESO HÚMEDO		
	PROTEÍNA	GRASA	HUMEDAD
Atún <i>Thunnus thynnus</i> .	23.3 - 27.5	1.2 - 8.0	67.7 - 72.6
Bacalao <i>Gadus Morhua</i> .	16.5 - 20.7	0.1 - 0.8	78.2 - 82.6
Salmón <i>Onchorhynchus spp.</i>	17.2 - 20.6	2.0 - 9.4	69.0 - 78.3

Fuente: Sikorsky, Z.E., 1994. [42]

Los músculos rojos, como los del salmón son ricos en cromoproteínas y contienen alrededor de dos a cinco veces más lípidos que los músculos blancos. [42]

En lo referente a la calidad de proteínas, la **tabla 1.2** presenta los valores que indican la calidad nutritiva de los salmones, que exponen alta calidad en aminoácidos y un buen índice de digestibilidad.

TABLA 1.2 VALORES TEÓRICOS DE CALIDAD PROTEICA DE LA CARNE CRUDA DE DIVERSOS GRUPOS DE PESCADOS

GRUPO	CALIFICACIÓN AMINOÁCIDICA	CALIFICACIÓN QUÍMICA	DIGESTIBILIDAD
<i>Clupeoidei</i> . (sardinas, boquerones, arenques)	100	72	90.2
Salmonoidei. (Truchas y salmones)	99	62	98.5
Scombroidei. (Atún, caballa listado y albácora)	96	61	98.9

Fuente: Sikorsky Z.E., 1994. [42]

Nota: los valores se calcularon a partir de las concentraciones de aminoácidos esenciales proporcionadas por la FAO en 1970. [42]

Aún con esto, existen diferencias cualitativas dentro de la familia, en especial entre truchas y salmones, puesto que se tiene la creencia de que el salmón salvaje tiene mayor calidad gastronómica que el cultivado, lo que se atribuye al estado físico que consigue el pez con la migración desde y hasta las aguas más frías como es el caso de Groenlandia. Aunque seguramente esta explicación no es la más acertada, se sabe que los salmónidos que se cultivan en criaderos y que no requieren condiciones climáticas tan exigentes tienen una carne más consistente y mucho más grasa que el salmón salvaje, situación que se acopla al caso de las truchas de criadero, comúnmente cultivadas en México. Ante esto, la especie de salmón más rica y codiciada por su tamaño, calidad de su carne y la dificultad que presenta el conseguirlo es el salmón rey (*Oncorhynchus tshawytscha*). No obstante, todo esto se fundamenta en las diferencias en composición química de ambas especies, como se muestra en **tabla 1.3**. [24]

TABLA 1.3 TABLA COMPARATIVA DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE TRUCHAS Y SALMONES

	SALMONES	TRUCHAS
Contenido Energético (de 100 gr. de porción comestible)	202 Kcal.	102 Kcal.
Componentes principales de 100 gr. de porción comestible.		
Agua	65.5 gr	76.3 gr
Proteína	19.9 gr	19.5 gr
Grasa	13.6 gr	2.7 gr
Sales minerales	1 gr	1.3 gr
Composición detallada de 100 gr. de porción comestible.		
Sales Minerales:		
Sodio	50 mg	40 mg
Potasio	370 mg	465 mg
Magnesio	30 mg	25 mg
Calcio	13 mg	18 mg
Manganeso	14 µg	30 µg
Hierro	1 mg	690 µg
Cobre	200 µg	150 µg
Cinc	800 µg	480 µg
Fósforo	265 mg	240 mg
Flúor	30 µg	30 µg

Yodo	35 µg	3 µg
Selenio	25 µg	80 µg
Vitaminas		
Vitamina A	65 µg	45 µg
Vitamina D	16 µg	-----
Vitamina B1	170 µg	85 µg
Vitamina B2	170 µg	75 µg
Nicotinamida	7 500 µg	3 410 µg
Ácido pantoténico	750 µg	-----
Vitamina B6	980 µg	-----
Biotina	1 µg	-----
Ácido fólico	20 µg	-----
Vitamina B12	3 µg	-----
Aminoácidos		
Arginina	1 330 mg	1400 mg
Histidina	660 mg	570 mg
Isoleucina	1 160 mg	1 270 mg
Leucina	1 770 mg	1 780 mg
Lisina	2 020 mg	2 020 mg
Metionina	700 mg	660 mg
Fenilalanina	910 mg	920 mg
Treonina	1 110 mg	1 080 mg
Triptófano	260 mg	240 mg
Tirosina	720 mg	680 mg
Valina	1 390 mg	1 250 mg
Lípidos		
Ácido palmítico	1 740 mg	260 mg
Ácido esteárico	350 mg	90 mg
Ácido oleico	2 960 mg	470 mg
Ácido linoleico	440 mg	75 mg
Ácido linolénico	550 mg	100 mg
Ácido araquidónico	300 mg	30 mg
Ácido eicosapentenoico	700 mg	150 mg
Ácido docosahexaenoico	2 140 mg	335 mg
Colesterol	35 mg	55 mg

Fuente: Senser, F. 1999. [40]

Comparativamente, al salmón corresponde el mayor valor nutritivo, especialmente debido a su contenido en vitaminas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos, mientras que presenta un menor nivel de colesterol, con respecto a la trucha.

1.3 TECNOLOGÍA Y PROCESADO DEL SALMÓN

El salmón se ha procesado por medio de dos procesos principales que resultan en salmón ahumado y salmón enlatado. Los procesos, los productos y sus características se presentan a continuación.

1.3.1 Salmón ahumado

Aunque la conservación es el objetivo principal al ahumar los filetes de pescado, este proceso también se ha utilizado para arreglarlo o enmascararlo, es decir, para darle un efecto cosmético al tejido. Los efectos del ahumado también se han utilizado para suplir la deficiente calidad del pescado que queda sin vender después de haber sido expuesto a la venta, de este modo, se ha disfrazado el pescado que podría ser menos fresco de lo que debiera. Por otro lado, se ha utilizado para copiar pescados caros encubriendo materias primas baratas. En el caso del salmón, esto puede suceder tiñendo el pescado a ahumar para darle un tono semejante al del salmón. [16]

Aún con esto, la conservación del pescado mediante el ahumado implica la deshidratación superficial del músculo creando una barrera al paso de microorganismos, con el salado se reduce la actividad de agua e inhibe el crecimiento de patógenos y microorganismos deteriorantes, la deposición de sustancias antioxidantes fenólicas retrasan la autoxidación de los lípidos del pescado y la deposición de sustancias antimicrobianas tales como fenoles, formaldehído y nitritos. [16]

El salmón es la especie más importante de las sometidas al ahumado. Para llevar a cabo este proceso se han utilizado dos métodos generales, el ahumado en frío y el ahumado en caliente. En el ahumado en frío el humo se aplica a las piezas a baja

temperatura (por debajo de los 37°C), mientras que en el ahumado en caliente (usando humo caliente) se aplican temperaturas de 65 a 120°C. [52,37]

En el procedimiento de ahumado en frío las proteínas del pescado crudo se tornan comestibles como consecuencia de su maduración enzimática, mientras que en el ahumado en caliente esto se produce en virtud de su desnaturalización por efecto del calor. [28]

Tiempo atrás se decía que el ahumado en caliente era el ahumado auténtico y sólo se aplicaba a las especies que soportaban el calor, sin embargo, hoy se conocen las grandes ventajas que presenta el ahumado en frío, y que en esencia obedecen a la mejor disponibilidad de nutrientes, mayor calidad de sabor, aunque esto depende en mayor parte del tipo de humo que se aplique, mayor cantidad de sustancias aromáticas y conservantes cuando se restringe el O₂ y, sobre todo, proporciona productos suficientemente seguros a nivel de inocuidad. [16, 52]

1.3.1.1 Descripción del proceso

El proceso que se utiliza actualmente para el ahumado del salmón, que se presenta en la **figura 1.3** (página 16), consiste en lo siguiente: [2]

Recepción y preparación de la materia prima. El material adecuado para el proceso del ahumado es el salmón refrigerado, mantenido en hielo por 24 horas aproximadamente después de su captura, o hasta que haya pasado por el rigor. El material puede provenir de cualquier especie de salmón, sin embargo, la etiqueta debe especificar la especie que ha sido procesada, por ejemplo “Salmón del Atlántico ahumado” o “Salmón rojo ahumado”. [2]

Preparación: El pescado completo se destripa cuidadosamente retirando las vísceras. Se remueve la sangre coagulada y las principales venas a lo largo de la columna vertebral y entonces se lava el vientre. Después de esto, se elimina la cabeza cortando a partir de las agallas. A partir de esto se obtienen dos filetes que se obtienen a partir del pescado descabezado, ambos contienen aletas y el hueso

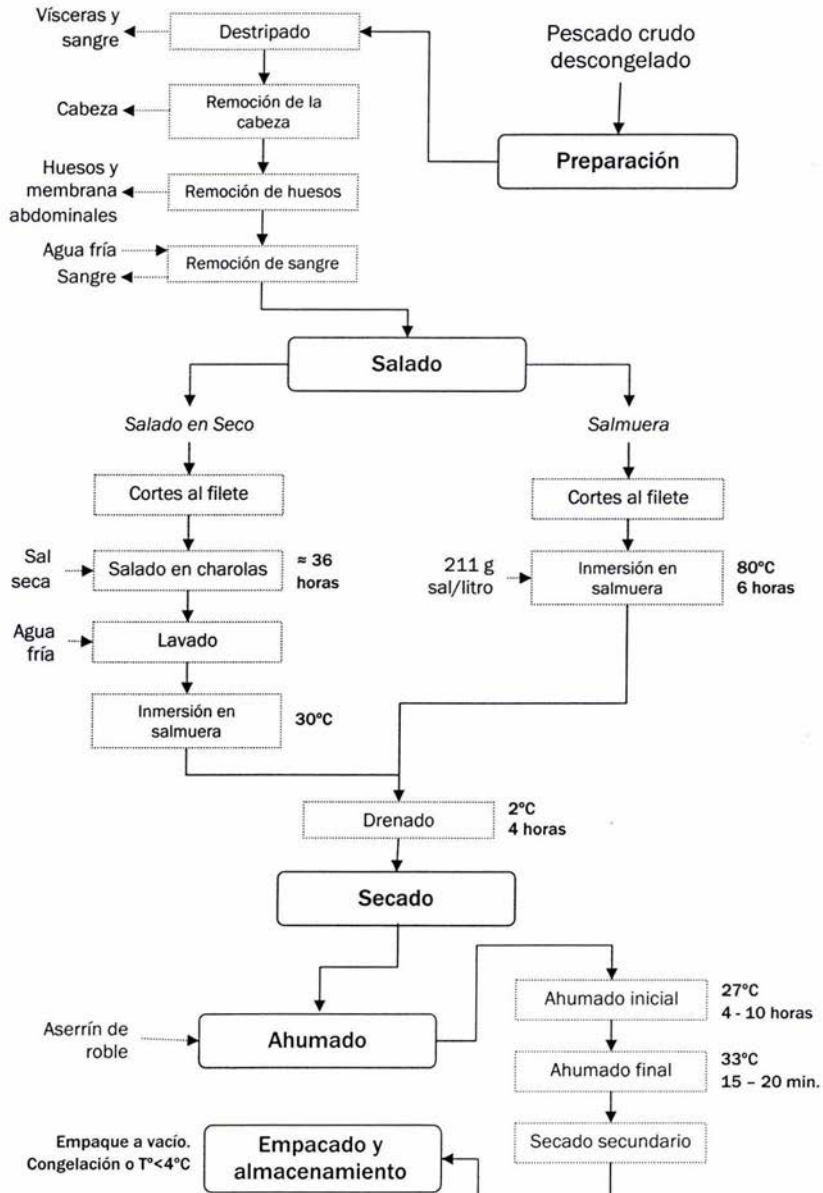


Figura 1.3 Diagrama del proceso para la obtención de salmón ahumado

provee soporte si el filete va a ser colgado para el ahumado. Los huesos abdominales y la membrana que los cubre se remueven cuidadosamente de cada filete para realzar la apariencia. La sangre se retira de las venas presionándolas hacia dentro, y cualquier resto de sangre en la superficie del filete se limpia con agua fría.

Salado: La sal se adiciona a los filetes del salmón en salmuera o por salado en seco. La utilización de salmuera proporciona un mejor brillo, sin embargo, el salado en seco implica menores tiempos de secado.

Para el salado en seco, se hacen tres cortes en el filete que únicamente penetran la piel, entonces los filetes se colocan en charolas con sal y se cubren con ésta. Los filetes permanecen en la sal menos de 36 horas, dependiendo del tamaño del salmón. Este proceso provee al menos 2 a 5 % en peso de sal al músculo. Los filetes salados se lavan en agua fría para remover la sal excedente de la superficie. Los filetes se sumergen en salmuera a 30°C por media hora dependiendo del tamaño del salmón, éstos pierden más del 9 % en peso con el salado en seco cuando la salmuera se retira.

En el método con salmuera no existe pérdida de peso. Para esto se hacen cortes en la piel del mismo modo que en el salado en seco, y los filetes se sumergen en salmuera a 80°C. La salmuera se prepara con 211 gramos de sal por litro de agua, el tiempo de inmersión depende del tamaño, aunque típicamente se utilizan 6 horas para filetes de 5 kg con alto contenido de grasa y 3 a 4 horas cuando tienen bajo contenido de grasa.

Los filetes, salados por cualquiera de los métodos, se drenan en refrigeración a 2°C por al menos 4 horas antes de ser secados.

Secado: Los filetes se cuelgan en un secador por aire, aunque también pueden ser dispuestos en charolas.

Ahumado: Se utiliza aserrín de maderas duras, preferentemente de roble, lo que imparte un agradable sabor al pescado. Se utiliza madera limpia y libre de conservadores y contaminantes.

En un horno mecánico, la temperatura se mantiene inicialmente a 27°C y los filetes tendidos en charolas o colgados se ahuman lentamente para prevenir el sobresecado de la superficie cortada y la formación de películas duras. El tiempo de residencia es usualmente de 4 a 10 horas dependiendo del tamaño y contenido de grasa del filete. Posteriormente se aumenta la temperatura del horno a 33°C por al menos 15 a 20 minutos para atraer el aceite a la superficie de los filetes y darles una apariencia atractiva. Después se corta el suministro de humo, dejando secar el pescado por el resto del tiempo con los ventiladores encendidos.

Empacado y Almacenamiento: El producto terminado debe ser protegido con un empaque higiénico. El empackado a vacío proporciona buena protección contra la deshidratación, rancidez y contaminación aunque provee condiciones en las cuales las bacterias tóxicas pueden crecer si el producto se mantiene tibio. El empaque a vacío debe estar almacenado en congelación o a temperaturas menores a 4°C. El salmón congelado se mantiene en buenas condiciones por al menos 6 meses.

Hasta aquí se ha presentado el proceso típico que se utiliza en estos días, aunque hoy en día la tecnología permite el uso de sustancia con sabor a humo y métodos de producción de humo sin llama. [42]

1.3.1.1 Normatividad

No existe una normatividad oficial para este tipo de productos, aunque existen normas mexicanas que reglamentan a los productos de salmón ahumado (NMX-497-1994-SCFI) y trucha ahumada (NMX-F-548-1996).

La norma referente a trucha ahumada declara que las únicas especies permitidas para la elaboración de trucha ahumada son: *Salmo gairdnerii* (Trucha arco iris), *Salmo trutta* (Trucha café) y *Salvelinus fontinalis* (Trucha brook), la cual en realidad es un salvelino y no propiamente una trucha. [45]

Por otro lado, la norma correspondiente a los productos de salmón ahumado declara la peculiar especificación en que las únicas especies permitidas para estos productos son *Oncorhynchus nerka*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus tshawytscha*, *Oncorhynchus gorbuscha*, *Oncorhynchus keta* y *Oncorhynchus masou*. De las cuales sólo el salmón rosado *Oncorhynchus gorbuscha* (en el texto de la norma no se especifica el nombre del pez) puede ser obtenido fresco en México. Lo más interesante es que no incluye al Salmón del Atlántico *Salmo salar* que es el más utilizado en los productos ahumados que se pueden obtener en los supermercados los cuales, generalmente son de origen chileno. [39]

Es importante desarrollar una normatividad oficial adecuada a la situación, que además contenga datos actuales y reglamente de modo adecuado el uso de las especies a ahumar, especialmente por su valor nutritivo y por sus aptitudes, en cuanto a su composición química, para someterse a este tipo de procesos.

1.3.2 Salmón enlatado

La posibilidad de sustituir una especie por otra también puede darse en este tipo de productos, pues generalmente, la carne picada presente en la lata no muestra signos de identidad específicos. [24]

El objetivo primordial del tratamiento térmico que conlleva el producto enlatado es destruir los microorganismos capaces de causar trastornos de la salud pública, así como aquellos responsables de la alteración de los productos envasados. La esterilización por calor se basa en reducir las probabilidades de supervivencia de las formas vegetativas de las bacterias o esporas bacterianas correspondientes. Para el caso, la amenaza pública principal de los alimentos enlatados la constituye *Clostridium botulinum* que es capaz de crecer en condiciones anaerobias (que se presentan en esta clase de productos) y que genera una toxina (toxina botulínica) cuya ingestión puede ser mortal. [31]

Este tipo de conservación implica la colocación del alimento adecuadamente preparado en una lata y el sellado doble de ésta para que, a continuación se

efectúe la operación de esterilización por calor. Esta operación previene la recontaminación de las latas, sobre todo durante el enfriado inicial de éstas, después del tratamiento térmico. [5]

El proceso completo para la esterilización del salmón en latas (figura 1.4), implica diversas etapas que se describen a continuación: [52]

Faenado: Mediante esta operación, el pescado fresco, recién recibido en la planta es despojado de aletas, cabeza y vísceras.

Limpieza: Los tejidos del pescado se someten a un lavado profundo con agua limpia y se seleccionan de modo que se eliminen los ejemplares desgarrados o con algún defecto notable. Esta operación también funciona como complemento de la faena, pues se eliminan por completo las vísceras y aletas que hayan permanecido en la operación anterior.

Cortado: El tejido limpio se corta en trozos tan pequeños como se desee, siempre que su tamaño sea adecuado para introducirse en las latas.

Cocción o tratamiento térmico previo al enlatado En esta operación se intenta reducir a aproximadamente un 65% la tasa de humedad existente en el pescado, lo cual evita la dilución de la salsa o aceite por el agua liberada durante la esterilización por calor. La carne se sumerge en agua caliente o salmuera (con un 5 a 10% de sal) a 90°C o bien se expone a la acción de vapor fluente hasta por 30 minutos.

Lavado de las latas o botes: Las latas se enjuagan con agua a presión o vapor antes de llenarse. Con esto se eliminan los microorganismos que puedan incrementar la carga bacteriana inicial del producto.

Envasado: Las latas se llenan con el producto de modo manual o automático.

Rellenado: Posteriormente las latas se llenan con agua, salmuera, aceite o salsa, según el tipo de producto.

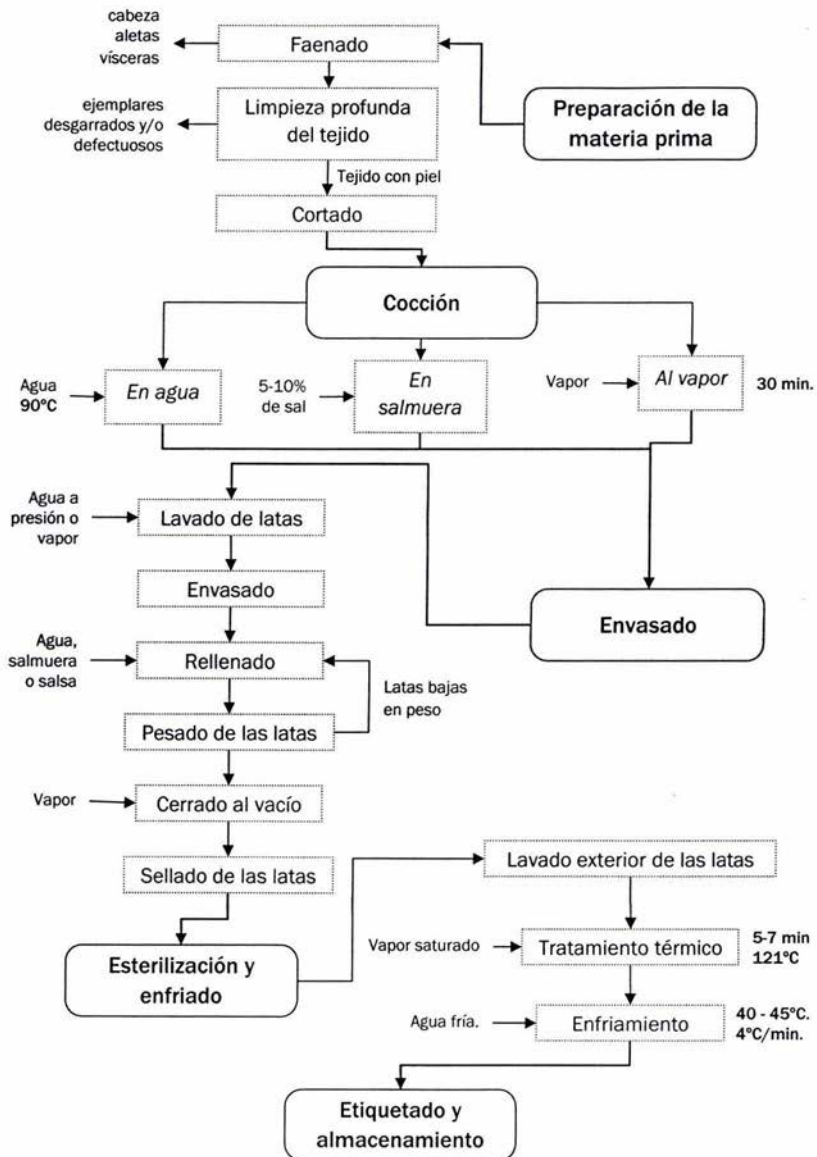


Figura 1.4 Diagrama del proceso de esterilización de salmón en latas

Pesado: La única función de esta operación es confirmar que la lata lleve la cantidad adecuada de pescado, siempre que el peso no se cumpla, las latas se regresan a la envasadora. Asimismo, un sobre llenado de las latas puede ocasionar que el producto no se procese adecuadamente.

Cerrado al vacío: Se coloca la tapa sobre las latas de modo que queden flojas, éstas son pasadas por una corriente de vapor que extrae todo el aire ocluido en la lata. De este modo se logra el vacío de las latas. Esta operación aumenta la estabilidad del producto enlatado.

Sellado: Las latas, con su tapa, son completamente selladas y troqueladas con los datos del producto. Esta operación se realiza inmediatamente después del cerrado al vacío.

Limpieza: Las latas se limpian inmediatamente para retirar cualquier tipo de materia extraña externa a la lata.

Esterilización: Las latas se disponen en la autoclave donde permanecen por 5 a 7 minutos a 121°C. Se utilizan 3 minutos para evitar riesgos de salud pública y 5 a 7 minutos para la prevención del deterioro por mesófilos. Así, en la prevención de termófilos se utilizan 5 a 7 minutos cuando los artículos enlatados se almacenan por debajo de los 30 °C y 15 a 21 minutos cuando los productos se almacenan a temperaturas mayores. Sin embargo, estos parámetros pueden variar siempre que varíe el tipo y tamaño del envase. [31]

Enfriamiento: Las latas se sitúan en una tina en la que son enfriadas con agua fría hasta que su temperatura disminuya hasta los 40-45°C.

Etiquetado: Las latas se etiquetan sólo hasta que se encuentren a temperatura ambiente.

En este proceso, los tejidos de salmón, como ya se ha planteado, son sometidos a importantes cambios debido al agresivo tratamiento térmico al que se sujetan, por lo que probablemente no se reconocerá el color original del salmón. Esto se debe a

la degradación de carotenoides y oxycarotenoides que acumulan los salmones en sus tejidos. [13]

1.4 PRODUCCIÓN, IMPORTACIÓN Y EXPORTACIÓN DE SALMONES Y TRUCHAS

Las cifras de importación de salmón han formado una base importante en el estudio presentado, debido a que el volumen de adquisición de salmón, en sus distintas presentaciones es muy desigual cuando se compara con la producción nacional.

De acuerdo con los datos de la FAO, en México no se produce salmón, como se muestra en la **figura 1.5**, sin embargo, la producción de trucha arco iris en nuestro país, aunque presenta cifras poco significativas, ésta va en aumento (3 309 toneladas en el año 2001), y esto puede verse con más detalle con los datos de importación y exportación para México en 2001 presentados en la **figura 1.6**. [11]

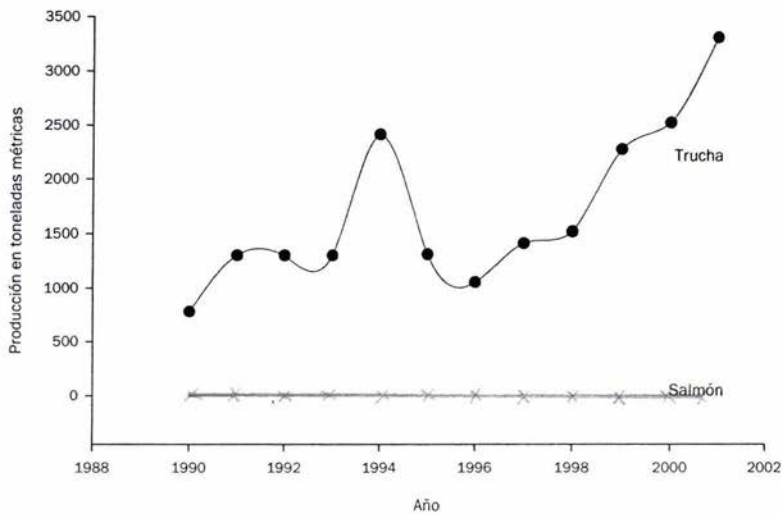


Figura 1.5 Producción de trucha arco iris y salmón en México

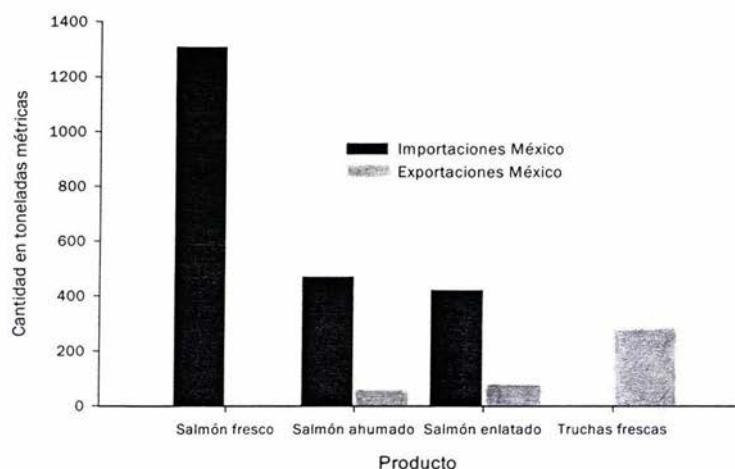


Figura 1.6 Importación y exportación de pescado fresco y procesado en México para el año 2001 (productos específicos)

Aunque en nuestro país no existe la producción de salmón, una cantidad importante de estos peces que se consumen y procesan en México, pertenecen a los volúmenes de importación. El salmón fresco importado es la base de las exportaciones existentes en salmones procesados o, las especies que se utilizan para la exportación de salmón mexicano procesado no son auténticas.

La producción de trucha arco iris en México rebasa en 200% a la cifra de importación del salmón mismo (1 309 toneladas para el año 2001), sin embargo se exporta sólo una pequeña cantidad (aproximadamente el 8% de la producción total, es decir, 264 toneladas de trucha arco iris en el año 2001), lo que implica su utilización para consumo interno. Esta situación expone a los productores nacionales y así como a las empresas importadoras, una gran posibilidad de sustituir el salmón auténtico, que no existe en México, por trucha arco iris disfrazada, que presenta grandes volúmenes de producción en este país. No con esto se pretende rechazar a la trucha arco iris como alimento, por lo que es aún más importante alentar a los productores de trucha en México para que procesen y ofrezcan productos procesados de trucha arco iris de modo que se reduzca la adulteración del salmón y, al mismo tiempo, la producción de trucha arco iris continúe en crecimiento con un buen objetivo.

CAPITULO 2. Aplicaciones biotecnológicas en la autenticación de alimentos. La PCR

2.1 MÉTODOS PARA AUTENTICACIÓN DE ALIMENTOS

La investigación científica involucrada en el tema de la autenticación de alimentos, que va íntimamente ligada a la identificación de especies, ha tenido un alto desarrollo en los últimos años con la implementación de protocolos de análisis de productos alimenticios basados en métodos enfocados al sondeo de características específicas de las especies, es decir, análisis de proteínas y, lo más fiel, el análisis de DNA.

2.1.1 Análisis de proteínas

El análisis de proteínas específicas de las especies se ha utilizado ampliamente bajo la necesidad de identificar a las especies o distinguir los orígenes del material para consumo humano. Los ensayos se basan en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, tales como tamaño o carga, propiedades que pueden ser reveladas como diferencias en su movilidad electroforética, puntos isoeléctricos o tiempo de elusión cromatográfica. A partir de los resultados obtenidos tras las 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. [23]

El método más utilizado para estas pruebas es la electroforesis en geles de poliacrilamida, geles con gradiente de concentración y geles con gradiente de pH, los cuales muestran bandas características de acuerdo a la proteína detectada. [27]

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 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. [21]

El análisis de proteínas también se ha utilizado en el área inmunológica para la identificación de especies utilizando anticuerpos que son producidos en contra de un grupo particular de proteínas (proteínas de diagnóstico o antígenos) siguiendo un procedimiento inmunológico estándar, en este caso, el anticuerpo producido es específico para el grupo de proteínas. Por ello, este ensayo es inespecífico cuando se trata de localizar adulteraciones en los productos por la mezcla de especies no declaradas en la etiqueta. Así mismo, si la proteína ha sufrido desnaturalización, el anticuerpo no es capaz de actuar sobre aquella proteína para la cual fue producido. [23]

En México, actualmente se dispone de algunos métodos rápidos para la identificación de especie animal basados en la prueba de ELISA (enzyme linked immunosorbent assays). Tales ensayos consisten en la utilización de anticuerpos específicos para proteínas de músculo estables al calor; siempre que dicha unión pueda efectuarse por la presencia de las proteínas para las cuales los anticuerpos fueron cultivados, la prueba producirá una coloración específica. Como se puede notar estas pruebas ya han sido diseñadas para la autenticación de especies tratadas térmicamente, sin embargo tiene importantes desventajas en cuanto a especificidad en contraste con los ensayos de DNA que se analizan posteriormente, por ejemplo, las pruebas, que se venden como kits, al estar diseñados para la detección de proteínas estables al calor, pierden especificidad cuando se desea diferenciar especies cercanamente relacionadas ya que dichas proteínas pueden pertenecer al tejido de diversas especies de una misma familia, como es el caso de la carne de res que reacciona con res y búfalo, para cerdo, reacciona solo con especies porcinas, en el caso de las aves reacciona con una gran variedad de especies avícolas y presenta reacción variable con huevos y para el borrego

reacciona con borrego y cabra. Las proteínas requeridas en este tipo de métodos son dependientes del músculo por lo que no pueden utilizarse en productos lácteos, por ejemplo. No se han desarrollado kits de este tipo para la autenticación de otro tipo de especies comestibles como el pescado.¹ [26]

2.1.2 Análisis de DNA

La molécula de DNA es una molécula biológica extremadamente estable y de larga vida. Tiene la característica de ser específica de las especies, es decir, muestra variabilidad en su configuración inter e, incluso, intra-específica, por la simple mutación en una sola base. Esta característica es lo que hace al análisis de ésta molécula, lo más adecuado para la búsqueda de autenticidad en los productos de alimentos procesados. [27]

La molécula, además, está presente en la mayoría de las células de un organismo, y todas ellas contienen la información idéntica que puede ser obtenida de cualquier muestra de la misma fuente, a pesar del tejido de origen. El DNA puede proveer potencialmente más información que una proteína. La molécula de DNA es más termoestable que muchas proteínas, lo que implica que es menos posible su alteración por el procesamiento de alimentos. Aún cuando llegue a ser degradada durante el tratamiento térmico, es posible obtener fragmentos con diferencias suficientes en la secuencia, que permita diferenciar e identificar a especies cercanamente relacionadas. Si bien es cierto que la molécula de DNA tiende a ser muy estable a bajas temperaturas, cuando el tejido es sometido al proceso de esterilización se degrada rápidamente dejando disponible a la molécula de DNA en fragmentos pequeños. Algunas investigaciones señalan que se han obtenido fragmentos menores de 500 pb. En este sentido, el tipo de tratamiento al que se someten los alimentos a autenticar ha sido el principal parámetro para la selección del método adecuado de autenticación. [6, 21, 23]

¹ Parte de la información fue proporcionada por MÉTODOS RÁPIDOS S.A. DE C.V.

El análisis de DNA está basado en la identificación de la molécula de DNA, para lo cual se han desarrollado dos métodos: 1) hibridación de DNA y 2) la reacción en cadena de la polimerasa. Ambos métodos requieren de la purificación de la molécula de DNA para su análisis.

2.1.2.1 Hibridación de DNA

El método de hibridación de DNA está basado en los procesos de desnaturalización - renaturalización de la cadena de DNA. Esta prueba se basa en la mezcla de hebras sencillas de ácido nucleico muestra, no marcado, (hebras diana) con una sonda de secuencia conocida, marcada, bajo condiciones experimentales que permitan el apareamiento entre bases complementarias. [22]

Esto requiere la desnaturalización previa de las hebras dúplex de DNA, lo que generalmente se lleva a cabo por calor, aunque también puede realizarse por agentes químicos. Una vez mezcladas, la sonda y la hebra diana, se permite la renaturalización, en la cual se espera que se formen híbridos sonda-diana, si la muestra fuera auténtica. [22]

La detección de los productos se puede llevar a cabo de diversas formas, lo que depende de la técnica que se utilice para realizar el ensayo. En la autenticación de alimentos comúnmente se han utilizado los métodos de hibridación en soporte sólido (filtro de nylon o nitrocelulosa): dot-blot y slot-blot. El primero consiste en aplicar la muestra gota a gota y el segundo consiste en aplicar la muestra en manchas alargadas.² Existen otras técnicas de hibridación, como Northern blot y Southern blot, que también se llevan a cabo en soporte sólido, y las técnicas de hibridación en líquido e *in situ*. Sin embargo, dichas técnicas no se han ensayado para la autenticación de alimentos. [22]

¹ De acuerdo con Lockley, este método se utilizó inicialmente para la detección de especies de carne, utilizando los métodos mencionados. Asimismo, este método ha sido muy apropiado para la detección de mezclas en los productos, siempre que se utilicen diferentes sondas para una muestra. [21]

2.1.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es el método más directo para identificar y autenticar especies. El propósito de la reacción es sintetizar millones de copias de un fragmento selecto (diana) de la molécula de DNA específica de la especie, que muestre diferencias en la secuencia de nucleótidos, incluso en especies cercanamente relacionadas, y de esta forma pueda ser analizado.

La replicación de una molécula ocurre mediante una reacción en la que un par de *primers* –que son pequeñas secuencias de nucleótidos sintéticos escogidos con secuencias complementarias a los finales opuestos de las cadenas simples del fragmento de DNA seleccionado– dirigen la síntesis de millones de copias del fragmento objetivo, y esta reacción se realiza por la acción de la enzima DNA polimerasa.

La enzima DNA polimerasa es requerida para la síntesis inicial y para la subsiguiente reacción en cadena, por medio de la cual se producen las copias del fragmento deseado. De esta forma se obtiene suficiente producto (amplificado) para ser analizado más profundamente por otros métodos, o bien, para ser secuenciado. [21]

La reacción en cadena de la polimerasa tiene un alto potencial para la identificación de especies debido a su creciente sensibilidad y especificidad cuando se compara con los ensayos de proteínas e hibridación con sondas de DNA. [27]

En conclusión, los métodos basados en la identificación de una o varias proteínas dependientes 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 fieles para la identificación de especies, sin embargo, el análisis de DNA por hibridación se ha descartado actualmente por su alto costo, lo que hace a la reacción en cadena de la polimerasa el método más adecuado para la autenticación de especies, en especial debido a que ésta puede ser utilizada como herramienta para una gran cantidad de análisis, (ver apartado 2.2.4), que definen su alta fidelidad para dicho fin.

2.2 DESCRIPCIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Aun cuando existe un gran número de métodos para la clonación y secuenciación de DNA, la PCR es el método más viejo en teoría y el más versátil en práctica. Es un método simple, rápido y flexible, al que pueden aplicarse un gran número de variaciones que dependen del propósito al que se aplica.

2.2.1 Fundamento de la PCR

El fundamento se basa en la síntesis de millones de copias de un fragmento específico de DNA delimitado por el apareamiento de dos moléculas cebadoras sintéticas (*primers*) con la molécula de DNA. La síntesis y copia del fragmento de DNA sucede por la acción de una DNA polimerasa, que une ácidos nucleicos sintéticos a la hebra simple de la molécula de DNA (que resulta de la desnaturalización de la cadena doble original), formando una nueva cadena doble que posteriormente será sujeto de desnaturalización y plantilla de nuevas moléculas de DNA.

2.2.2 Etapas de la reacción

Esta reacción no es precisamente una técnica, sino una metodología en la que se aplican tres conceptos fundamentales: 1) desnaturalización de la cadena doble de DNA, 2) hibridación de la hebra sencilla con un oligonucleótido y 3) replicación de las hebras sencillas de DNA por la acción de una DNA polimerasa a partir del oligonucleótido mencionado.

Todas las etapas de la reacción se definen especialmente por llevarse a cabo a temperaturas distintas. La **figura 2.1** (página 31) representa el orden en que sucede la reacción, partiendo de una sola cadena de DNA que en realidad es mucho más larga e, inicialmente, presenta su conformación helicoidal.

2.2.2.1 Desnaturalización

La desnaturalización del DNA es estrictamente requerida para la obtención de hebras simples de la molécula de DNA.

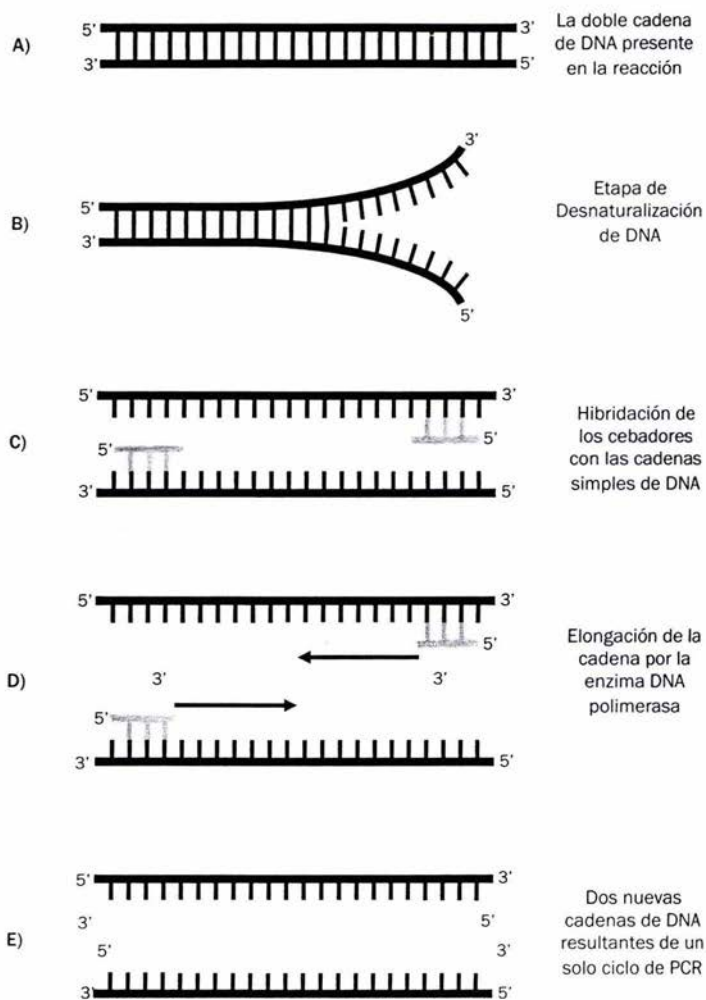


Figura 2.1 Representación del mecanismo de la PCR

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. La **figura 2.1,B** representa este fenómeno, sin embargo, no puede visualizarse la ruptura de los enlaces hidrofóbicos entre las bases apiladas aunque si se entiende la separación y ruptura de los puentes de hidrógeno. [22]

La desnaturalización puede llevarse a cabo por efecto de agentes 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 de desnaturalización debe ser superior a la de fusión (T_m) de la región de DNA que se desea amplificar. [22]

2.2.2.2 Hibridación

Se llama así debido a que en esta etapa las hebras sencillas se unen a los oligonucleótidos sintéticos. Esta etapa se asemeja en gran medida al método ya mencionado de hibridación de DNA, aunque en este caso, el DNA se une a una hebra corta (<30 nt) de nucleótidos sintéticos que servirán para iniciar la reacción.

Esta etapa también se denomina etapa de templado debido a la disminución de temperatura que permite la reasociación de hebras sencillas tras la desnaturalización térmica; en inglés annealing. La **figura 2.1,C** representa esta etapa. Los oligonucleótidos (representados por dos cadenas cortas de 3 nucleótidos) se unen a una región específica y complementaria del DNA original en dirección 5'→3'. [22]

Esta etapa requiere un enfriamiento rápido por debajo de la T_m (temperatura de fusión)³ de los oligonucleótidos de forma que suceda la hibridación. Las

³ La temperatura de fusión, o melting (T_m), se relaciona directamente con la desnaturalización y depende del contenido en pares de bases C≡G o A=T de la cadena de DNA. Mientras los pares de bases C≡G sean más abundantes que A=T, la temperatura de fusión aumentará debido a que la interacción en C≡G es más fuerte que A=T. Esto implica que, para que suceda la desnaturalización, la T_m deba ser

temperaturas usuales están en un rango de 37 y 65°C que se mantienen entre 10 y 20 segundos. [22]

2.2.2.3 Elongación (extensión, replicación o polimerización)

Esta es la etapa de amplificación propiamente dicha, la DNA polimerasa se encarga de elongar 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 desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs).

La replicación se lleva a cabo en la dirección 5'→3' a partir del extremo 3'-OH de cada cebador, hasta terminar la lectura de la plantilla o hasta que comience una nueva etapa de desnaturalización. Esta etapa queda representada en la **figura 2.1,D** (página 31). La enzima DNA polimerasa no ha sido simbolizada, sin embargo se ha encargado de unir ya algunos dNTP's a la cadena complementaria siguiendo la dirección 5'→3' a partir de los cebadores.

Al finalizar esta etapa se obtienen cadenas dobles nuevamente, pero duplicando a las que existían al principio de la desnaturalización. Nótese que en un primer ciclo las cadenas nuevas no tienen un tamaño especial (**figura 2.1,E**), sin embargo, este se irá afinando conforme los 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 y, al mismo tiempo, es posible asegurar 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 fragmentos.

Las tres etapas mencionadas se repiten cíclicamente. El número de ciclos puede variar en un rango de 20 y 40 ciclos. El comportamiento de las cadenas de DNA

rebasada y todas las interacciones logren romperse y viceversa, la temperatura de hibridación debe ser menor que T_m para que las hebras puedan unirse por completo. La temperatura de fusión se calcula: $T_m = 4(\#G + \#C) + 2(\#A + \#T)$.

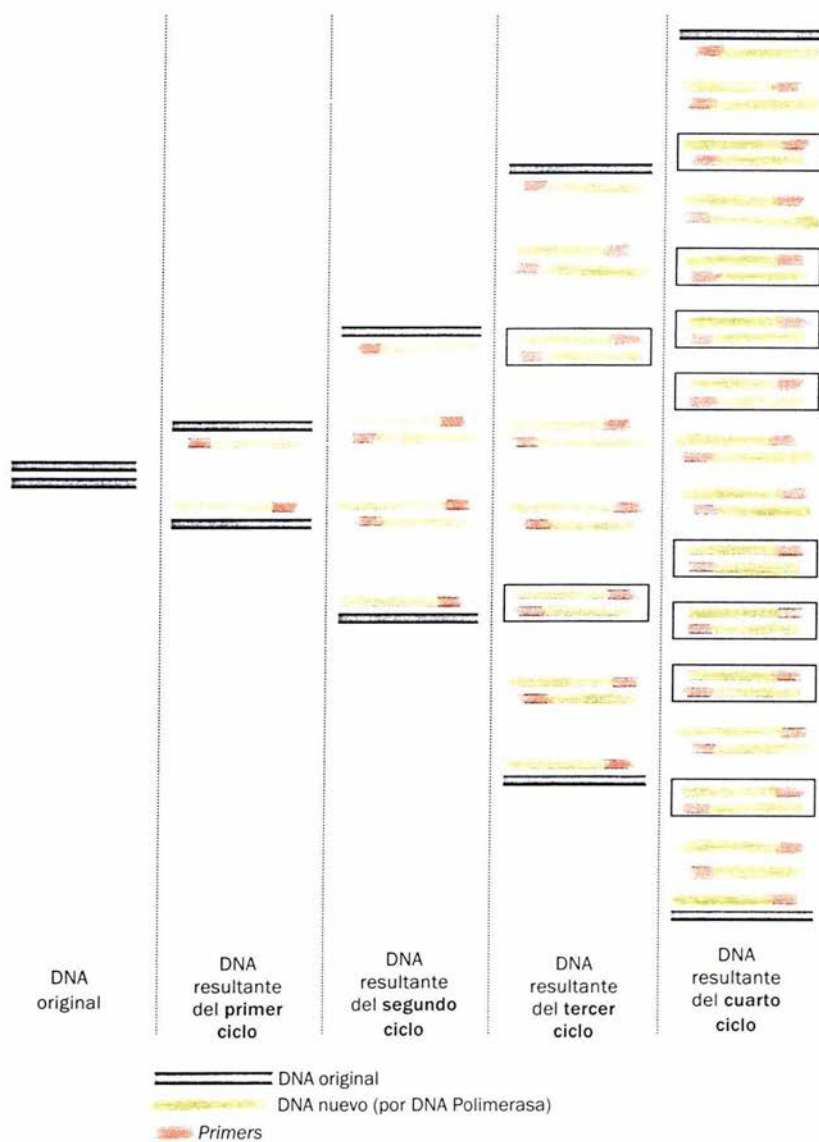


Figura 2.2 DNA resultante en el transcurso de los ciclos

resultantes de cada ciclo se representa en la **figura 2.2** (página 34). Nótese que los fragmentos no presentan el tamaño esperado sino hasta el tercer ciclo (marcados en un recuadro).

2.2.3 Componentes de la reacción

Después de describir las etapas de la reacción, es simple visualizar los componentes principales que requiere la reacción: 1) un par oligonucleótidos o *primers*, 2) dNTPs en exceso, 3) la DNA polimerasa y, por supuesto, 4) la plantilla de DNA a amplificar. Cada uno de estos componentes tienen funciones específicas y, de acuerdo con el protocolo de amplificación, deben tener características específicas.

2.2.3.1 Oligonucleótidos

De los tantos factores que influyen la eficiencia y especificidad de la reacción de amplificación, ninguno es más crucial que el diseño de los *primers* de oligonucleótidos. Éstos son moléculas sintéticas de cadena sencilla y de secuencia corta (18 a 30 nt) cuyas secuencias deben ser complementarias al extremo 3' de cada una de las hebras sencillas del fragmento diana. De este modo, los oligonucleótidos funcionan como cebadores para la replicación del fragmento diana. De acuerdo con lo expuesto, estos oligos delimitan la longitud de la plantilla de DNA a amplificar.

El éxito de la reacción, como se expone anteriormente, recae principalmente en un buen diseño de *primers*, pues la carencia de una unión perfecta entre el DNA diana y el extremo 3' del *primer* puede conducir a un fallo en la PCR. La selección de *primers* requiere un diseño cuidadoso para la obtención de los productos deseados debido a que tales *primers* influyen fuertemente en el éxito o fracaso de la PCR, lo que implica el cumplimiento de características especiales que dependen en gran medida de la secuencia diana por sí misma. Su selección adecuada reflejará el grado de especificidad de éstos ante la especie en cuestión e incluso su correcto desempeño durante la reacción. [40,43]

El diseño y selección de *primers* debe girar en torno a los requerimientos que señala la **tabla 2.1**.

TABLA 2.1 DISEÑO DE *PRIMERS*: PROPIEDADES DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS QUE INFLUENCIAN LA EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN⁴

PROPIEDAD	DISEÑO ÓPTIMO
Composición de las bases	El contenido de G+C debería estar entre un 40 y 60% en la secuencia. Las cuatro bases deberían estar distribuidas a lo largo de toda la secuencia.
Longitud	La región del <i>primer</i> complementaria a la plantilla de DNA debe ser de 18 a 25 nucleótidos de largo. Así pues, es recomendable que el par de <i>primers</i> sea de la misma longitud o, en todo caso, no rebase una diferencia de 3 nucleótidos.
Secuencias repetidas y complementarias a sí mismas	No deben presentarse secuencias repetidas en la secuencia invertida (secuencia complementaria) o secuencias complementarias entre <i>primers</i> que sean mayores a 3 pares de bases de longitud. Las secuencias de este tipo tienden a formar estructuras tipo horquilla las cuales, si son estables bajo las condiciones de PCR, pueden prevenir efectivamente el <i>annealing</i> del oligonucleótido con su plantilla.
Complementariedad entre los miembros de un par de <i>primers</i>	Las secuencias terminales en 3' de un <i>primer</i> no deben ser capaces de unirse a cualquier sitio del otro <i>primer</i> . Debido a que los <i>primers</i> se presentan a altas concentraciones en PCR, aún teniendo una débil complementariedad entre ellos permite la formación de híbridos y consecuentemente, la síntesis y amplificación de dímeros de <i>primers</i> . Si se forman prematuramente en la PCR, pueden competir por la DNA polimerasa, <i>primers</i> y nucleótidos, por lo que pueden suprimir la amplificación de la plantilla de DNA.
Temperatura de fusión (T_m)	La temperatura de fusión (T_m) calculada para ambos miembros del par de <i>primers</i> no debe diferir en 5°C o más. La T_m del producto amplificado no debe diferir por más de 10°C con los valores de T_m del par de oligos. Esta propiedad asegura que el producto amplificado será eficientemente desnaturalizado durante cada ciclo de PCR.
Terminación en 3'	La naturaleza del final 3' de los <i>primers</i> es crucial. Si es posible, la base en 3' debe ser G o C. Sin embargo, los <i>primers</i> con la secuencia NNCG o NNGC a su final 3' no son recomendados debido al inusual alto ΔG de las bases GC terminales, lo que propicia la formación de horquillas y puede generar dímeros de <i>primers</i> .
Localización en sitios de amplificación	Dependiendo del propósito del experimento, la localización de los sitios de amplificación puede estar encerrado por la localización de mutaciones, sitios de restricción, secuencias codificantes o microsatélites

⁴ La tabla presentada es una adaptación de la publicada por Sambrook J. y Russel E. En su libro, *Molecular Cloning. A laboratory Manual* donde además se propone la metodología para el diseño y selección de *primers*, ya sea basándose en bases de datos o por medios manuales. [39]

2.2.3.2 DNA polimerasa termoestable

La enzima DNA polimerasa se encarga de unir nucleótidos los dNTPs a la cadena complementaria a partir del cebador, formando una nueva cadena doble de DNA a partir de una cadena sencilla.

Debido a que las etapas de reacción involucran temperaturas variables, es requerida una enzima termoestable que, igualmente, soporte temperaturas cercanas a los 100°C. Esta característica es la que le permite a la enzima actuar durante varios ciclos sin desactivarse. Aunque existe una gran variedad de enzimas, la enzima más empleada es la *Taq* polimerasa, cuyo nombre se debe a que es procedente de una bacteria llamada *Thermus aquaticus*⁵.

2.2.3.3 Desoxynucleosidos trifosfatos (dNTPs) en exceso

Son 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, dTTPs, dGTPs y dCTPs.

2.2.3.4 Cationes divalentes

Todas las DNA Polimerasas Termoestables requieren de cationes divalentes libres para su actividad, usualmente Mg^{2+} , sin embargo, la presencia de éstos está más íntimamente ligada con la presencia de dNTPs y oligonucleótidos, debido a que son ellos los que se unen al catión. La concentración molar del catión, por lo tanto, debe exceder la concentración molar de los grupos fosfato que aportan los dNTPs más los *primers*. [40]

⁵ La *Taq* polimerasa tiene el inconveniente de carecer de actividad correctora de pruebas (exonucleasa 3'), por lo que la frecuencia de errores es superior a la de replicación (alrededor de un error por cada 5,000 nucleótidos incorporados); de ahí que en ocasiones se sustituya por otras DNA Polimerasas Termoestables. Así pues, aunque la *Taq* polimerasa fue la primera enzima termoestable aislada, en estudios más vastos de PCR (ej. Cuando se requiere mayor fidelidad, la longitud de la plantilla a amplificar es mayor de 1kb o cuando se desea clonar el RNA mitocondrial utilizando la PCR inversa), la *Taq* Polimerasa ha mostrado ciertas desventajas con respecto a otras enzimas que ya están disponibles. han descrito las propiedades y aplicaciones de DNA Polimerasas Termoestables. La descripción incluye ~10 enzimas distintas de la *Taq* polimerasa. [22, 39]

2.2.3.5 DNA diana

La adición de DNA a la reacción implica su previa extracción de la célula o del tejido y su solubilización en agua. En teoría, si se utilizan las condiciones óptimas en relación con los *primers*, el número de ciclos aplicados, la concentración del resto de componentes y el volumen de la reacción, –de manera que trabaje al máximo–, entonces debe ser suficiente la adición de una simple cadena de DNA al inicio de la reacción. Es requerida una concentración adecuada para lograr una amplificación adecuada⁶. Si la concentración de DNA es menor, es probable que no se visualice una banda clara en un gel de agarosa, por otro lado, si la concentración es muy alta, la DNA polimerasa probablemente no podrá actuar sobre las cadenas desnaturalizadas de DNA.

2.2.4 Análisis del producto de la PCR

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

1. Métodos simples (no requieren métodos complementarios para la identificación de especies):

- ▮ *Primers* específicos de las especies
- ▮ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

2. Métodos complementarios a la PCR.

- ▮ Secuenciación
- ▮ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- ▮ SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)

En este sentido, las técnicas para la identificación de especies pueden ser clasificadas de acuerdo a la naturaleza de los fragmentos diana a identificar: primero, las 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 o tiene muy pocas locaciones en genes, se utilizan los análisis 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. [15]

2.2.4.1 Primers específicos de las especies

Cuando se refiere a la utilización de *primers* específicos de las especies, se espera que los *primers* generen sólo un producto en la presencia de DNA a partir de las especies dadas, bajo condiciones estrictas e idóneas de reacción. La información de la secuencia completa permite predecir el tamaño del producto, de modo que la identificación se confirma si el amplificado se ve del tamaño apropiado en un gel, es decir, la presencia del producto de PCR es considerado como prueba de la identidad. La **figura 2.3** muestra el perfil que presentaría una muestra amplificada correctamente por este método, en cuyo caso, el **carril A** muestra el marcador molecular, el **carril B y C** muestran productos de PCR con *primers* específicos de cierta especie que hubieran sido diseñados esperando la amplificación de un fragmento de ~750 pb. El caso **B** no muestra amplificado puesto que el *primer* no habría apareado con la especie, siendo esta una especie extraña (diferente a la buscada), por el contrario, el caso **C** presenta una banda correspondiente al tamaño esperado, lo que implica que representaría la presencia de la especie buscada. [21,43]

La utilización de este protocolo implica el desarrollo de características específicas para la especie a analizar y, sobre todo, el conocimiento previo de la secuencia completa de la especie cuestionada para la selección y diseño de *primers* apropiados como se ha manejado anteriormente.

⁶ Experimentalmente se ha conocido que la concentración adecuada es cercana a 3.5 µg/µl.

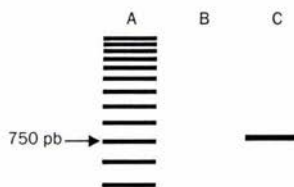


Figura 2.3 Análisis electroforético para productos de PCR que utilizaron *primers* específicos

2.2.4.2 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Para un análisis RAPD se requieren *primers* cortos de ~10 bases que forman híbridos al azar con muchas plantillas del DNA genómico. Los *primers* no están diseñados para amplificar un fragmento específico; por el contrario, forman híbridos dispersos a lo largo de todo el genoma. Dadas las condiciones apropiadas para la reacción PCR, la amplificación resultante resulta en un patrón electroforético que comprende bandas de distintos tamaños. Se ha comprobado que ciertos patrones son específicos de las especies. Diferentes pares de *primers* producirán diferentes patrones, de los cuales su uso es determinado empíricamente. [21,43]

2.2.4.3 Secuenciación de los productos de PCR

A este método se le conoce como FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequence). Este método representa el modo más directo para la identificación de especies, siempre que sea posible la comparación del DNA desconocido con las secuencias de especies en una base de datos de referencia. [43]

Aún cuando este método permite identificar especies, es comúnmente utilizado como herramienta para la aplicación de otros métodos, por ejemplo, la selección de enzimas de restricción para un análisis de polimorfismos de restricción, lo que permite predecir los perfiles esperados, o el diseño y selección de *primers*.

2.2.4.4 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

En el análisis RFLP –conocido en español como análisis de polimorfismos de restricción–, se escogen grupos de enzimas (endonucleasas)⁷ tomando en cuenta su habilidad para reconocer y cortar secciones de secuencias de nucleótidos dentro de un fragmento particular de DNA. Estas secciones son separadas por tamaño en un gel de electroforesis, resultando perfiles específicos de las especies. Esta técnica tiene la ventaja (incluso sobre SSCP) de tener la capacidad de diferenciar muestras con especies mezcladas. [23]

A partir de la secuenciación de los productos de amplificación por PCR es posible identificar diferencias en la secuencia de bases de los productos que quieren ser diferenciados. Estas secuencias son el blanco que emplearán las enzimas de restricción (endonucleasas) para cortar y separar el fragmento producido por la PCR, sin embargo, para lograrlo se precisa la selección de una enzima de restricción que sea capaz de reconocer la secuencia blanco y pueda cortarla.

En primera instancia, la mayoría de las enzimas de restricción reconocen secuencias denominadas palíndromas⁸, que son habitualmente de 4 ó 6 pb. Estas enzimas son capaces de reconocer en toda la longitud de DNA ciertas secuencias características, cortando a la cadena en tantos fragmentos como sitios de restricción sean encontrados. La **tabla 2.2** muestra las secuencias de reconocimiento de algunas enzimas de restricción.

TABLA 2.2 SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO DE ALGUNAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

ENZIMAS	SECUENCIA	MICROORGANISMO
AccI	GT/(^a c)(G)AC	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
AluI	AG/CT	<i>Anthrobacter luteus</i>
Apal	GGGCC/C	<i>Acetobacter pasteurianis</i>
BamHI	G/GATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>

⁷ Las enzimas de restricción o endonucleasas son enzimas que se aíslan a partir de microorganismos, ya que estos las producen como defensa ante virus DNA que intenten parasitar al microorganismo. Las enzimas de restricción actúan como tijeras cortando el DNA de estos virus.

⁸ Un palíndromo es una palabra o frase que se puede leer igual tanto de izquierda a derecha como de derecha a izquierda. En nuestro caso, se trata de secuencias de nucleótidos que pueden ser leídas en la misma dirección para secuencias complementarias, es decir, ambas en dirección 5'→3'.

BstXI	CCE(N) ₅ /NTGG	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
ClaI	AT/CGAT	<i>Caryophanon latum</i> L
(=Bsp106I)		(<i>Bacillus sphaericus</i>)
DarII	PuG/GNCPPy	<i>Deinococcus radiophilus</i>
(=EcoO109I)		(<i>Escherichia coli</i>)
EcoRI	G/AATTC	<i>Escherichia coli</i>
EcoRV	GAT/ATC	<i>Escherichia coli</i>
HaeIII	CG/CC	<i>Haemophilus aegyptius</i>
HincII	GTPy/PuAC	<i>Haemophilus Influenzae</i> serotype c, 1160
(=HindII)		(<i>Haemophilus influenzae</i> R _d)
Hind III	A/AGCTT	<i>Haemophilus Influenzae</i> R _d
HpaII	C/CGG	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
(=MspI)		(<i>Moraxella species</i>)
KpnI	GGTAC/C	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK 8
MstII	CC/TNAGG	<i>Microcoleus species</i> (algae blue)
NotI	GC/GGCCGC	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
PstI	CTGCA/G	<i>Providencia stuartii</i> 164
PvuI	CGAT/CG	<i>Proteus vulgaris</i>
SacII	CCGC/GG	<i>Streptomyces achromogenes</i>
Sall	G/TCGAC	<i>Streptomyces albus</i> G
Sau3A	/GATC	<i>Staphylococcus aureus</i> 3 ^a
(=MboI)		(<i>Moraxella Boris</i>)
SmaI	CCC/GGG	<i>Serratia marcescens</i> S _b
SpeI	A/CTAGT	<i>Sphaerotilus species</i>
SphI	GCATG/C	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
SstI	GAGCT/C	<i>Streptomyces stanford</i>
(=SacI)		(<i>Streptomyces achromogenes</i>)
XbaI	T/CTAGA	<i>Xanthomonas badrii</i>
XhoI	C/TCGAG	<i>Xanthomonas holcicola</i>
XmaI	C/CCGGG	<i>Xanthomonas Malvacearum</i>
XmaIII	C/GGCCG	<i>Xanthomonas Malvacearum</i>
(=EagI)		(<i>Enterobacter agglomerans</i>)

Fuente: Étienne, J. 2001. [10]

Una vez que las enzimas han actuado sobre los fragmentos amplificados por PCR, se analizan por electroforesis utilizando un marcador molecular. Esto implica que la secuencia de los productos de PCR sea conocida al igual que el tamaño de los

fragmentos que producirían los cortes con las endonucleasas⁹. La **figura 2.4** muestra, el perfil electroforético que mostrarían los fragmentos resultantes, donde el **carril A** muestra el perfil que presentaría un marcador molecular de 1 Kb, el **carril B** muestra el perfil original del fragmento antes de la restricción cuya medida, para este ejemplo, sería de ~900 pb, el **carril C** representa el caso de que la muestra hubiera sido sometida a la restricción por una endonucleasa selectiva que no encontró sitios de restricción; el **carril D** muestra la completa restricción del fragmento por la endonucleasa selectiva que ha cortado el fragmento de 900 pb en dos fragmentos más pequeños (para la circunstancia específica de que sólo se halle un solo sitio de restricción), el primero de ~600 pb y el segundo de ~300 pb; el **carril E** representa el caso en el que se hubieran encontrado sitios de restricción en algunas cadenas resultantes de la amplificación, sin embargo, la presencia de banda correspondiente al tamaño original muestra que no todas las cadenas contenían el sitio de restricción buscado, por lo que existe una mezcla de especies.

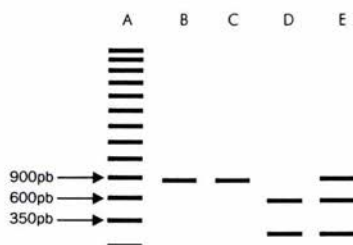


Figura 2.4 Perfil electroforético de un gel con muestras digeridas utilizando enzimas de restricción

La prueba RFLP muestra por lo tanto, su capacidad para diferenciar muestras que por la utilización de *primers* específicos (incluso cuando se han utilizado *primers* específicos para una especie) 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.

⁹ Es recomendable la secuenciación del amplificado producido por PCR, para conocer la secuencia real de la muestra que se desea cortar.

Se ha demostrado la necesidad de amplificar zonas con un alto contenido en mutaciones, (Ej. la zona del citocromo b del DNA Mitocondrial), para hacer posible la localización de sitios de restricción específicos de la especie buscada, que a su vez no se repitan en otras especies¹⁰. De este modo se encontraría un protocolo específico para la autenticación de dicha especie. [6, 7]

A nivel comercial se han desarrollado algunos protocolos que utilizan este método para la identificación de especies animales en alimentos, principalmente cerdo, cordero, pollo y pavo e incluso pescados y mariscos. Los protocolos están disponibles en Europa, donde la Universidad Complutense de Madrid es uno de los principales proveedores de este tipo de protocolos ofreciendo la adaptación tecnológica y capacitación a los organismos interesados en este tipo de metodologías de autenticación. [26]

Los métodos están basados en la amplificación por PCR con primers universales y su posterior digestión con enzimas de restricción específicas de la especie, de acuerdo con los polimorfismos que presenten las secuencias a diferenciar. Por este medio se puede identificar a la especie adulterante inequívocamente (en el caso de que existiera), sin embargo, este tipo de análisis pueden llegar a ser muy costosos cuando sólo se quiere autenticar a la especie que cierto producto involucre, especialmente por lo costosas que pueden llegar a ser las enzimas de restricción. [26]

2.2.4.5 SSCP (Single strand conformational polymorphism)

Después de que la reacción es utilizada para amplificar la misma región de DNA a partir de diferentes especies, generalmente una parte del gen citocromo b del DNA mitocondrial, se procede a una desnaturalización de las dobles cadenas producidas, que puede llevarse a cabo utilizando un solvente desnaturalizador; las cadenas simples de DNA adoptan una estructura secundaria que es dependiente

¹⁰ El análisis se muestra más específico y fácil de proyectar cuando se han diseñado y seleccionado *primers* específicos de las especies, pues, a partir de esto, se ha limitado el espectro de especies que tengan que analizarse para evitar la repetición de sitios de restricción que, incluso, lleguen a mostrar perfiles similares aún después del RFLP

de su secuencia. Con electroforesis en gel de poliacrilamida, bajo condiciones apropiadas, los productos con diferentes estructuras secundarias exhiben diferentes movilidades electroforéticas y se obtienen diferentes patrones, pequeñas diferencias en la secuencia de nucleótidos produce una migración diferente de las cadenas simples. [21, 23]

La técnica es simple, rápida y suficientemente sensible para detectar el cambio de una base o algunas diferencias en fragmentos cortos de la secuencia de DNA. [36]

Los análisis SSCP y RFLP consumen menos tiempo y dinero que la secuenciación y son más convenientes para la identificación rutinaria de las especies. [23]

CAPITULO 3. Metodología experimental

La metodología y estrategia general utilizada en este trabajo ha seguido las recomendaciones del Dr. José Francisco Montiel Sosa. [29, 30]

3.1 CUADRO METODOLÓGICO

El cuadro metodológico utilizado en la experimentación pertinente a este trabajo se muestra en la **figura 3.1** (página 47).

3.1.1 Descripción del cuadro metodológico

La metodología planteada consta de 5 objetivos particulares y una actividad preliminar que se refiere a la extracción y cuantificación de DNA. Dicha actividad fue planteada de esta forma debido a que no forma parte específica del estudio que se pretende realizar, sin embargo es a través de ella que se obtienen las muestras adecuadas para la experimentación correspondiente a cada uno de los objetivos planteados.

El objetivo general del trabajo fue desarrollar un protocolo para autenticar especies de salmón fresco y térmicamente procesado cuya etiqueta declara contener salmón, aplicando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basado en la identificación y amplificación de regiones específicas del ADN mitocondrial, para la detección de adulteraciones en los productos

3.1.1.1 Actividad preliminar

Extraer y cuantificar el DNA total de las muestras objetivo, dando lugar a soluciones listas para su análisis por medio de PCR.

Para realizar esta actividad se ha utilizado un protocolo de extracción que se ha modificado a partir del protocolo clásico descrito por Sambrook, J. basado en la desintegración del tejido usando detergentes y proteinasas, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, y la precipitación de DNA con etanol. Posteriormente, a

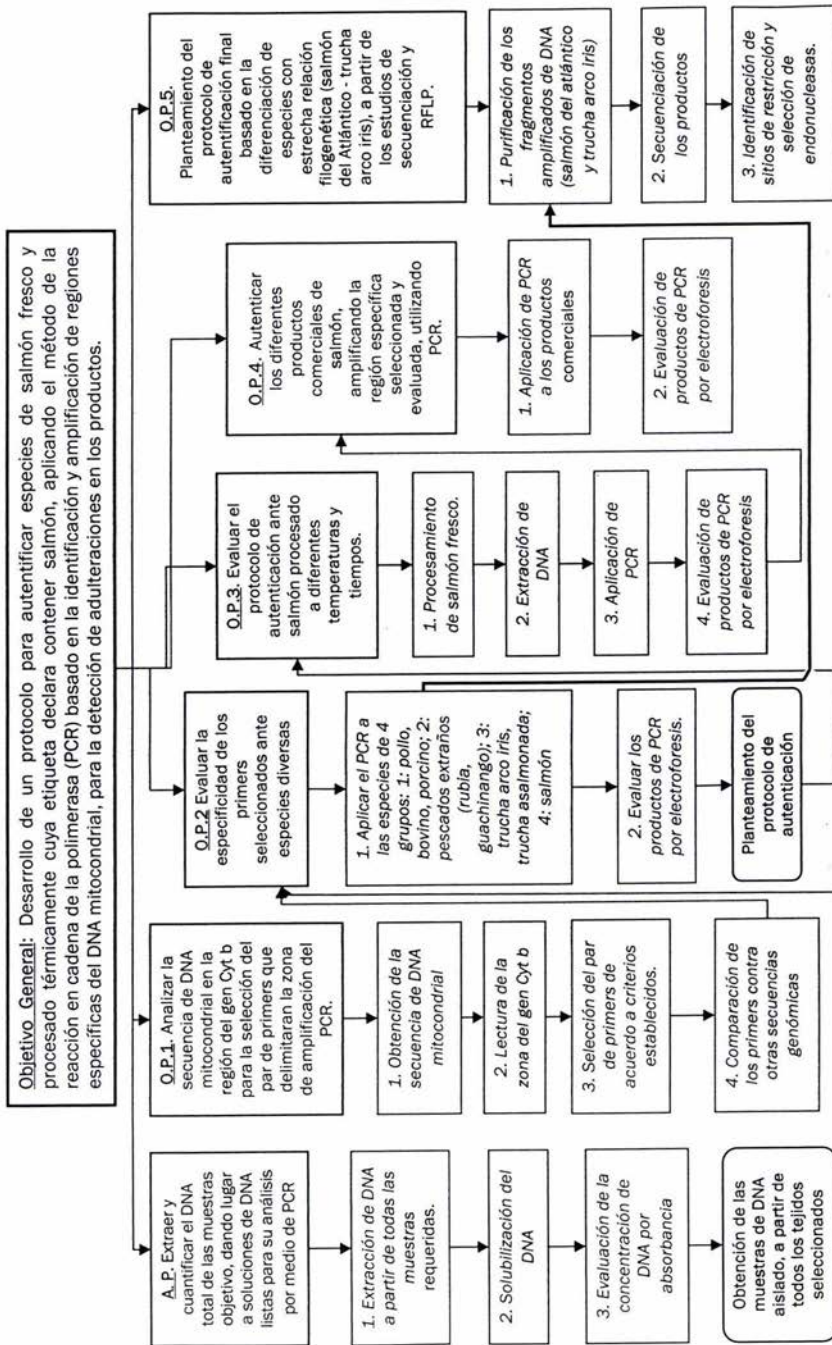


Figura 3.1. Cuadro metodológico.

fin de alistar el DNA para la amplificación, ha sido requerida la solubilización de este en agua desionizada¹¹ y el posterior almacenamiento a temperaturas aproximadas a los -18°C . [27]

Por último es necesario conocer cuantitativamente la pureza y concentración de DNA en disolución, lo que es importante para determinar la cantidad de solución que se añadirá a la reacción. El análisis se hizo mediante la medición de absorbancia para ácidos nucleicos y proteínas (a 260 y 280 nm).

3.1.1.2 Objetivo particular 1

Analizar la secuencia del DNA mitocondrial del salmón en la región del gen Cyt b para la selección del par de *primers* que delimitarán el fragmento diana para la amplificación.

La selección y diseño de *primers* es la parte crucial del desarrollo de un protocolo de autenticación. Este objetivo se cumplió de acuerdo con lo siguiente:

3. Obtención de la secuencia de DNA Mitocondrial para salmón rey (*Oncorhynchus tshawytscha*)¹²
4. Lectura de la zona del gen cyt b.
5. Selección y diseño del par de *primers* de acuerdo con los requisitos y recomendaciones mencionados en la **tabla 2.2** en el capítulo 2.
6. Comparación de la especificidad de los *primers* mediante el programa bioinformático Fasta 3 que proporciona el EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute), que compara la secuencia seleccionada con las de otras especies.

3.1.1.3 Objetivo particular 2

Evaluar la especificidad de los *primers* seleccionados ante especies diversas.

¹¹ El agua utilizada debe cumplir con dos características esenciales: 1) ser agua libre de impurezas que puedan afectar a la reacción o que puedan degradar al DNA durante el almacenamiento; 2) tener un pH neutro para la adecuada conservación de DNA.

¹² Aunque este salmón (salmón rey) no es una especie que se consiga en el mercado mexicano, se utilizó su secuencia debido a su disponibilidad en las bases de datos de genomas, lo que no afecta en gran medida puesto que se trata de especies de la misma familia.

La especificidad de los *primers* se determinó para su amplificación con cuatro grupos específicos de animales, *grupo 1*, pollo, bovino, porcino; *grupo 2*, pescados extraños (rubia, guachinango); *grupo 3*, trucha arco iris, trucha asalmonada; *grupo 4*, salmón fresco identificado por sus características morfológicas. El grupo 3 y 4 fueron los que se atendieron más ampliamente, puesto que las especies del grupo 3 pueden ser objeto adulterante de los productos de salmón, y el grupo 4, representa la validez de los *primers* para reconocer al salmón.

La evaluación se llevó a cabo únicamente mediante el uso de PCR y electroforesis:

1. Aplicación de la PCR a las muestras de cada grupo utilizado el par de *primers* seleccionado.
2. Evaluación de productos de PCR utilizando el método de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%, a ~80 V.

3.1.1.4 Objetivo particular 3

Evaluar el protocolo de amplificación ante salmón tratado a diferentes temperaturas.

Este objetivo permitió conocer la validez del protocolo para la autenticación de productos de salmón enlatado.

1. Procesado de salmón a temperaturas de 40, 60, 80 y 92°C por 10 minutos, y a 121°C por 2 segundos, 1, 2, 5 y 10 minutos simulando ciertas condiciones de proceso térmico.
2. Aplicación de la PCR a todas las muestras ya procesadas.
3. Evaluación de los productos de la amplificación utilizando electroforesis en geles de agarosa al 2%, a ~80V.

3.1.1.5 Objetivo particular 4

Autenticar los diferentes productos comerciales de salmón, amplificando la región específica seleccionada y evaluada, utilizando PCR.

Este objetivo en particular es propiamente la autenticación del salmón. Hasta aquí, el protocolo ha sido evaluado y aprobado para su aplicación, que se lleva a cabo como sigue:

1. Amplificación de las plantillas de DNA aisladas de muestras de salmón procesado comercialmente, ahumado y enlatado (los productos se describen con mayor detalle en el apartado referente a “Materiales”, (página 51).
2. Evaluación de los productos de la amplificación utilizando el método de electroforesis en geles de agarosa al 2%, a ~80 V.

3.1.1.6 Objetivo particular 5

Planteamiento del protocolo de autenticación final basado en la diferenciación de especies filogenéticamente cercanas (Salmón del Atlántico – Trucha arco iris), a partir de los estudios de secuenciación y RFLP.

Este objetivo plantea un estudio más profundo en la autenticación de especies que toma en cuenta la problemática que más probablemente puede presentarse en la adulteración de salmón. El estudio es una aportación más avanzada de la autenticación de especies que permitirá identificar salmón o al agente adulterante más probable, la trucha arco iris, en un modo más convincente. Aunque está planteado para salmón del atlántico, una ampliación del estudio permitiría identificar otro tipo de salmones e, incluso, otro tipo de agentes adulterantes de la familia de los salmónidos.

El planteamiento se desarrolló como sigue:

1. Purificación de DNA utilizando Exo-SAP it, a partir del amplificado de PCR de las muestras frescas de salmón del atlántico y trucha arco iris. El detalle de la purificación se presenta en el apartado correspondiente.
2. Secuenciación automática de los fragmentos amplificados y purificados (FES Iztacala)
3. Análisis de la secuencia y selección de enzimas de restricción utilizando programas bioinformáticos (ChromasPro Versión 1.13 y Redasoft Visual Clonning versión 3.0).
4. Planteamiento del protocolo de autenticación por RFLP.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Material biológico

De acuerdo a lo que se describe en el cuadro metodológico, las muestras objetivo requeridas fueron las siguientes:

Muestras en fresco:

- ▮ Pollo (*Gallus gallus domesticus*)
- ▮ Porcino
- ▮ Bovino
- ▮ Rubia (*Lutjanus inermis*)
- ▮ Guachinango (*Lutjanus argentiventris*)
- ▮ Trucha Asalmonada (*Salmo trutta morpha fario*)
- ▮ Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)
- ▮ Salmón (especies comercialmente no identificadas)
- ▮ Salmón del Atlántico (*Salmo salar*)

Muestras Procesadas:

- ▮ Salmón Ahumado en rebanadas y empacado al vacío marca Kea Light. Especie: Salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Procedencia: Chile. Importador: Punto Austral S.A. de C.V.
- ▮ Salmón Ahumado en rebanadas y empacado al vacío marca Delfish Ltda. Especie: Salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Procedencia: Chile. Importador: Punto Austral S.A. de C.V.
- ▮ Salmón Ahumado en rebanadas y empacado al vacío marca Aguas Claras. Especie: Salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Procedencia: Chile. Importador: Diproal S.A. de C.V.



- ▮ Salmón enlatado en aceite marca Brunswick. Especie: Salmón Rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*). Procedencia: Alaska.
- ▮ Salmón ahumado usado como relleno en aceitunas enlatadas en salmuera marca Jolca. Especie: no especifica. Procedencia: España.
- ▮ Salmón marinado usado como relleno en aceitunas enlatadas en salmuera marca La Española. Especie: no especifica. Procedencia: España.



De cada una de las muestras se extrajo un peso aproximado a 50 gramos, que fue molido y homogenizado. Las muestras así tratadas se mantuvieron en congelación por periodos no mayores a 15 días hasta llevar a cabo la extracción de DNA.

3.2.2 Reactivos y productos biológicos

Los reactivos y productos biológicos que se muestran a continuación se agrupan de acuerdo al método en el que fueron empleados:

Extracción de DNA:

- ▮ Agua desionizada o bidestilada con pH de 7.
- ▮ Solución de lisis (Tris base 50mM, pH=8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%).
- ▮ Enzima proteasa a concentración de 20 mg/ml marca Qiagen.
- ▮ Mezcla Fenol – Cloroformo – Alcohol isoamílico, en proporción 25:24:1.
- ▮ Etanol frío.

Amplificación (PCR)

- ▮ Kit de PCR marca Promega que contiene:
- Agua libre de nucleasas.

- ▶ PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA Polimerasa, 400 μ M de cada dNTP y 3mM de MgCl₂).
- ▶ Pareja de *Primers* producidos por Invitrogen.

Electroforesis

- ▶ Agarosa marca Gibco BRL, Life Technologies.
- ▶ Tris Acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8.
- ▶ Bromuro de etidio en concentración de 10mg/ml.
- ▶ Marcador de peso molecular de 1kb marca Promega.
- ▶ Tinte cargador azul/naranja 6X, marca Promega.

Purificación de DNA

- ▶ Mezcla de enzimas hidrolíticas Exo SAP-IT marca USB.

3.2.3 Equipo utilizado

- ▶ Agitador Vortex marca Lab-Line, modelo Super Mixer 1290.
- ▶ Balanza Analítica Electrónica Ohaus, modelo AS200
- ▶ Calentador para tubos eppendorf, modelo Multi-Blok, marca Lab-Line
- ▶ Espectrofotómetro marca WPA, modelo UV1101 Biotech Fotometer
- ▶ Microcentrífuga refrigerada marca Sorvall RMC 14
- ▶ Termociclador marca Perkin Elmer modelo Gene Amp PCR system 2400
- ▶ Juego de micropipetas marca Finnpiet de volúmenes desde 0.5 μ l hasta 1000 μ l.
- ▶ Cámara de electroforesis horizontal pequeña de 16x4x6.5 cms (Largo x alto x ancho), con un área de soporte del gel de 7.5 x 5 cm (Largo x ancho).
- ▶ Cámara de electroforesis horizontal grande marca BRL, modelo Horizon 11:14.
- ▶ Fuente de poder marca EC, modelo EC105

- ▮ Fuente de poder marca Biorad, modelo Power Pac 1000
- ▮ Secuenciador automático modelo 3100 Genetic analyzer
- ▮ Horno de microondas marca Panasonic
- ▮ Transiluminador marca UVP, modelo M-15E
- ▮ Transiluminador marca Cole Parmer, modelo 9814-series tables.
- ▮ Equipo de Fotografía para luz UV marca Kodak Digital Science. (Cámara fotográfica DC40, software: Kodak Digital Science 1D Versión 2.0.2.
- ▮ Autoclave

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Extracción de DNA total a partir de tejido muscular

Para la extracción de DNA de las muestras de alimentos se utilizó un protocolo modificado por Dra. Patricia Miranda Castro y M. en C. Esperanza García a partir del protocolo clásico descrito por Sambrook, J. que está basado en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinasas, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico y la precipitación del DNA con etanol. El protocolo completo se describe a continuación: [27]

Disgregación del tejido:

1. Enjuagar el tejido con agua estéril y no tocarlo con las manos, usar guantes.
2. Congelar una porción de tejido (en nitrógeno líquido o en congelador normal).
3. Moler el fragmento de carne utilizando un mortero
4. Pesar 0.125 gr de carne en un tubo Eppendorff
5. Adicionar 1.25 ml de solución lisis
6. Agitar con vortex hasta que se visualicen pedazos más pequeños.
7. Adicionar 7 µl de enzima proteasa previamente concentrada a 20 mg/ml
8. Incubar los tubos a 50°C en termoblok por 2 horas.

9. Desactivar la enzima manteniendo la temperatura del termoblok a 60°C por lo menos una hora.

Extracción de proteínas y polisacáridos:

1. Adicionar al tubo que contiene la muestra, 0.25 ml de la mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
2. Mezclar el tubo varias veces suavemente
3. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente
4. Separar las fases, recuperar la fase acuosa superior que contiene el DNA. Evitar recuperar cualquiera de las otras fases.
5. Trasladar la fase recuperada a 2 tubos eppendorff nuevos

Precipitación de DNA

1. Adicionar 1.5ml de etanol frío a cada tubo
2. Mezclar suavemente (puede aparecer turbidez y luego desaparecer)
3. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min.
4. Decantar el etanol y dejar secar el DNA en incubadora a 37°C colocando los tubos en forma horizontal. El DNA debe visualizarse pegado al tubo como una mancha blanca.
5. Una vez eliminado el etanol, se adiciona agua desionizada para resuspender DNA agitando suavemente el tubo hasta su completa disolución.
6. Cuando la solución presenta partículas insolubles, se reintenta la extracción de proteínas y polisacáridos con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, y se vuelve a lavar con etanol.

3.3.2 Cuantificación de DNA por medición de absorbancia a 260 nm

Este método es útil para preparaciones de ácidos nucleicos altamente puras, pues se detecta cualquier compuesto que absorbe la luz significativamente a 260 nm, lo cual incluye, por ejemplo, DNA, RNA, EDTA y fenol. La relación de absorbancia a 260 nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de DNA y RNA con proteína, puesto que los aminoácidos aromáticos absorben la luz a 280 nm. En este caso, sólo un nivel significativo de proteína en la preparación puede

causar un cambio significativo en la relación de absorbancia de ambas longitudes de onda. [40]

Para cuantificar la cantidad de DNA, las lecturas se toman a 260 y 280 nm. La lectura de 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una unidad de densidad óptica corresponde a aprox. 50 µg/ml de DNA de doble hebra. La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA tienen valores de 1.8, mientras que valores de 2, muestran la existencia de preparaciones puras de RNA. Si existe contaminación significativa con fenol o proteínas, la relación 260/280 será menor de 1.8, entonces no se puede cuantificar el DNA presente en la solución. [40, 49]

El protocolo utilizado se describe como sigue:

1. Tomar una muestra de 10µl de DNA y se adicionan 490µl de agua destilada, de modo que se conserve una proporción 1:50.
2. Realizar las mediciones de absorbancia a 260 y 280 para cada una de las muestras en el espectrofotómetro con emisión de luz UV utilizando celdas de de 1 cm² y 500 µl de volumen. Con los valores resultantes se obtiene:

$$\frac{Abs_{260}}{Abs_{280}} \approx 1.8 - 1.9$$

Sabiendo, por tanto, que una unidad de A_{260} corresponde a una concentración de 50 µg/ml, la concentración de DNA se obtiene del siguiente modo:

$$[\mu g/\mu l] = Abs_{260} \times \frac{50\mu g}{ml} \times \frac{Vol.final}{Vol.inicial} \times \frac{1ml}{1000\mu l}$$

donde la concentración está dada en µg/µl y los términos involucran el valor dado de Abs a 260 nm, la concentración correspondiente a una unidad de absorbancia, la dilución de la solución de DNA, que para el caso es 500µl/10µl, y por último, el factor de conversión de ml a µl.

3.3.3 Amplificación de DNA

3.3.3.1 Preparación de la reacción

Para la preparación de la reacción ha sido fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes (*Primers* y DNA). Los *primers* deben ser solubilizados a una concentración de 250 μM , mientras que el DNA requiere una concentración relativamente baja puesto que, teóricamente, una sola copia del DNA debería ser suficiente para una adecuada amplificación, sin embargo, la extracción de DNA implica la colecta de millones de cadenas originales. Experimentalmente se utilizó una solución de DNA de aprox. $3.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$. [22]

La preparación de las muestras para la reacción se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo que precisa Promega para el kit de PCR. Los componentes se prepararon en tubos de 25 μl como se muestra en la tabla 3.1.

TABLA 3.1 COMPONENTES DE LA PCR, PREPARACIÓN DE LOS ENSAYOS

COMPONENTE	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Mezcla master mix (kit)	12.5 μl	1X
<i>Primer 1</i>	0.25-2.5 μl	0.1-1.0 μM
<i>Primer 2</i>	0.25-2.5 μl	0.1-1.0 μM
DNA	1-5 μl	<250ng
Agua libre de nucleasas	La necesaria para completar 25 μl	N. A.

Cuando ya se ha ajustado la concentración de *primers* y DNA, el volumen aplicado para el adecuado cumplimiento de la reacción fue de 0.5 μl de cada *primer* y 1 μl de DNA.

3.3.3.2 Etapas y ciclos de la reacción

La programación del termociclador se efectuó de acuerdo a la figura 3.2. Las condiciones dadas están basadas en las recomendaciones de Promega para la utilización de la mezcla master mix para PCR. La etapa de hibridación se realiza a 60°C, pues debe coincidir con la T_m calculada para los *primers*. La etapa inicial funciona como una etapa de desnaturalización extendida, en la que se pretende

desnaturalizar por completo a las cadenas originales, además se aplica para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra. La etapa final tiene como objetivo terminar de extender las cadenas que aún estén incompletas. Nótese que la conservación del producto de PCR es a 4°C. A partir de este momento no es recomendable congelar las muestras para el posterior análisis, puesto que la formación de cristales de agua puede ocasionar daño a los fragmentos ya formados y, por tanto, una detección deficiente del producto. El programa tuvo una duración total de 1 hora 40 minutos, con 30 ciclos. [22]

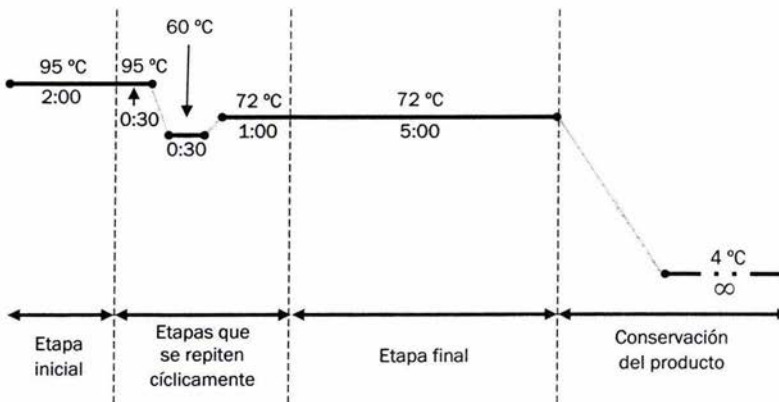


Figura 3.2 Esquematización del programa utilizado en el termociclador

3.3.4 Análisis de productos

3.3.4.1 Preparación del gel de agarosa

Los componentes de un gel de agarosa al 2% adecuado para la electroforesis se mezclan como se presenta en la **tabla 3.2**:

TABLA 3.2 COMPONENTES DE UN GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS

COMPONENTE	CANTIDAD (GEL PEQUEÑO)	CANTIDAD (GEL GRANDE)
Agarosa	0.6 gr	2 gr
BrEt ¹³ en concentración de 10mg/ml	1 µl	3 µl
TAE 1X	29.4 ml	98 ml

El método de preparación simplemente sigue el siguiente protocolo:

1. Se cierran las aperturas laterales del soporte del gel.
2. Se pesa la agarosa y adicionar el TAE 1X, es preferible que la mezcla se realice en un vaso de precipitado largo de 200 ml.
3. En este momento es preciso pesar la mezcla.
4. La mezcla es calentada en horno de microondas a potencia baja, hasta que quede bien disuelta.
5. Nuevamente se pesa la mezcla y se añade agua hasta que se iguale el peso inicial de la mezcla.
6. Se añade el BrEt y se mezcla bien.
7. La mezcla se vierte en el soporte cuidando que no se formen burbujas, si se forman es preciso removerlas. Inmediatamente después se colocan los peines.
8. Se deja solidificar el gel en una zona nivelada y libre de corrientes de aire.
9. Antes de cargar el gel con muestra, se retiran los y se coloca el soporte con el gel en la cámara de electroforesis; por último es indispensable adicionar TAE 1X a la cámara de modo que el gel quede cubierto.

El gel puede ser conservado a temperatura de refrigeración, siempre que se encuentre sumergido en buffer TAE 1X.

¹³ El bromuro de etidio es un colorante fluorescente altamente tóxico esencial para la tinción del DNA en el gel. Esta molécula se intercala entre las bases apiladas del DNA creando una unión del tipo Van der Waals con las bases de la cadena. Después de la inserción dentro de la hélice, el colorante permanece perpendicular al eje helicoidal teniendo contacto con la base superior e inferior. La posición arreglada de la molécula y su proximidad a las bases causa que el colorante exhiba un campo fluorescente. [39]

3.3.4.2 Electroforesis horizontal (carga y corrida del gel)

La técnica de electroforesis horizontal es capaz de separar fragmentos que no pueden ser separados adecuadamente por otros procedimientos. La utilización de agarosa para la separación de moléculas de DNA del tamaño esperado en este estudio, es fundamental pues, mientras que un gel de poliacrilamida puede diferenciar moléculas con un rango de desigualdad de tan sólo 1 pb, no es capaz de soportar moléculas mayores a 500 pb. La agarosa tiene un poder de resolución menor, sin embargo, tiene un mayor rango de separación (50 a 20,000 pb).

La resolución y el grado de migración, sin embargo, de los fragmentos de DNA en el gel, dependen en cierto grado, del voltaje aplicado. Para obtener la resolución máxima de los fragmentos de DNA >2 Kb en tamaño, los geles de agarosa deben correr a no más de 5 a 8 V/cm. [40].

La técnica se ha llevado a cabo, por tanto, a 70V en un gel de 7.5 cm de largo. Los posillos del gel se cargaron de acuerdo a los volúmenes que se especifican en la **tabla 3.3**, siguiendo el protocolo contiguo.

TABLA 3.3 VOLUMEN DE LOS COMPONENTES UTILIZADOS EN LA ELECTROFORESIS

COMPONENTE	VOLUMEN
BrEt 0.01µg/ml	3 µl
Blue Orange 6X Loading Dye ¹⁴	4 µl
Muestra o agua o marcador de peso molecular	5 µl

1. En un trozo de parafilm se sitúan tantas gotas de colorante (Tinte cargador azul/naranja 6X) como número de muestras + blanco + marcador de peso molecular, evitando incorporar burbujas dentro de la gota.
2. Posteriormente se añaden las gotas de BrEt adjuntas a las gotas de colorante sin que se mezclen.

¹⁴ Este componente es el buffer de carga del gel, que se mezcla con las muestras antes de cargarlas. Tiene 3 propósitos: 1) Incrementar la densidad de la muestra, 2) Asegurar que el DNA descienda uniformemente dentro del posillo y 3) Añadir color a la muestra, con lo que se simplifica el proceso de carga. Este compuesto contiene colorantes que migran hacia el ánodo en un campo eléctrico.

3. Finalmente se adicionan las gotas de muestra, o agua en el caso de blanco, o marcador de peso molecular. Una a una se mezclan con los siguientes componentes, se recogen y se depositan en el posillo correspondiente.
4. Cuando se ha terminado de cargar el gel, se cierra la cámara y se conecta a la fuente de poder (80V). El cátodo se conecta en el extremo cercano a los posillos, de modo que la molécula migre hacia el ánodo.
5. La corrida dura hasta que el colorante se visualice cerca del extremo contrario.

3.3.4.3 Fotografías de los geles

Las fotografías de los geles se tomaron utilizando una cámara Kodak DC40 especial para fotografiar geles teñidos con bromuro de etidio e iluminados con luz UV. Estas condiciones son esenciales para el análisis para la detección del bromuro de etidio intercalado en los fragmentos de DNA presentes en el gel, esto es debido a que la radiación UV es absorbida a 254 nm por el DNA y transmitida al colorante. El colorante unido por si mismo absorbe la luz a 302 nm y 366 nm. En ambos casos, la energía es re-emitida a 590 nm en la región rojo-naranja del espectro visible. [40]

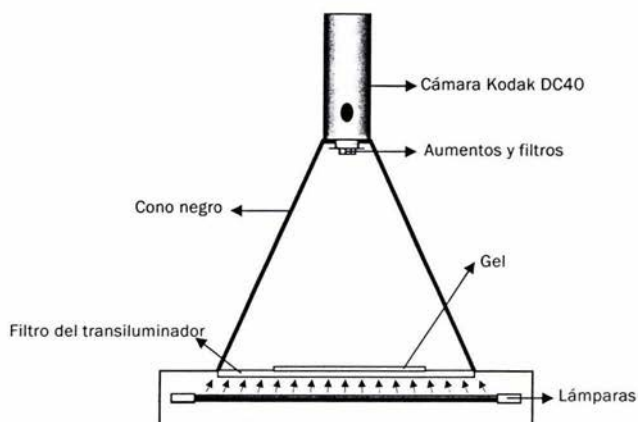


Figura 3.3 Fotografía de geles por iluminación UV

El gel se fotografía de acuerdo con la **figura 3.3** y la imagen se envía a un ordenador que la procesa en el software adecuado (Kodak Digital Science 1D Versión 2.0.2).

3.3.5 Purificación de DNA

Para la purificación de DNA se utilizó ExoSAP-IT. Este producto prepara los productos de la PCR para la secuenciación, eliminando los *primers* sobrantes y los dNTPs no consumidos en la reacción. El producto utiliza dos enzimas hidrolíticas, exonucleasa I y fosfatasa alcalina, juntas en un buffer formulado especialmente para remover dNTPs y *primers* no deseados.

La exonucleasa I degrada los *primers* de hebra sencilla residuales, así como el DNA de hebra sencilla producido en el PCR. La fosfatasa alcalina hidroliza los dNTPs sobrantes directamente al producto del PCR. Las enzimas están activas en el buffer usado para PCR.

El protocolo de utilización de este producto para la purificación de DNA es como sigue:

1. A 5µl del producto de PCR, se añaden 2µl de ExoSAP-IT. La mezcla se efectúa en un tubo para PCR nuevo.
2. Se agita el tubo y se incuba a 37°C por 15 minutos en el termociclador.
3. ExoSAP-IT se inactiva elevando la temperatura a 80°C por 15 minutos en el termociclador.
4. El producto, una vez tratado, debe ser almacenado a -20°C hasta que se use en la secuenciación.

3.3.6 Secuenciación de DNA

La secuenciación de los productos de PCR se realizó mediante la técnica de secuenciación automática. El análisis se hizo en vinculación con al Facultad de Estudios Superiores Iztacala por medio de un secuenciador automático modelo 3100 Genetic analyzer con Química de DNA ABI Prism BigDye Terminator chemistry, Movilidad DT3100pop6(BD)v2, en capilar de 50cm.

3.3.7 Diseño de RFLP

El diseño del protocolo para la realización de RFLP se realizó de modo que permita diferenciar entre las dos especies más susceptibles a la adulteración y, por lo tanto, a la autenticación, que son el salmón del atlántico y la trucha arco iris.

El diseño es simple y fácil de plantear siempre que se cuente con el apoyo de un programa bioinformático, como es el caso del ChromasPro versión 1.13 o Redasoft Visual Cloning 3.0.

El software se encarga de encontrar los sitios de restricción que engloba el fragmento, por ello, ambas secuencias se analizan, en principio, para todas las enzimas de restricción. El mapa de sitios de restricción que muestra el software es la base para la búsqueda de la enzima de restricción adecuada.

La endonucleasa más adecuada para el caso del salmón y la trucha, es la que:

- Es capaz de dividir los fragmentos en secciones más cortas cuyos tamaños puedan ser visualizados aun en un gel donde las muestras corren junto a un marcador de peso molecular de 1Kb.
- Los fragmentos obtenidos deben diferir en por lo menos 50 pb de longitud, con el fin de que la diferencia pueda visualizarse en un gel de agarosa.
- Preferentemente, el número de fragmentos a obtener debe ser diferente entre una y otra muestra.

Tomando tales consideraciones, es necesario analizar uno a uno los sitios de restricción y fragmentos resultantes para cada una de las enzimas que mostraron afinidad por los fragmentos y elegir la más adaptada para esta distinción.

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1 DISEÑO Y SELECCIÓN DE PRIMERS

Aún cuando ya existen algunos *primers* publicados con los que se han amplificado algunas especies de salmones, no se utilizaron en este trabajo dado que no obedecían las características de especificidad necesarias para cumplir el objetivo planteado. Tal es el caso del trabajo publicado por Hold, L (2001) que, aunque logró la amplificación de diversas especies de salmones dirigiendo la PCR al gen citocromo b del DNA mitocondrial, utilizó *primers* universales, por lo que también se amplificaron especies de merluza, anguila, sardina y rodaballo, lo que no es adecuado con el objetivo planteado. Carrera, E (1999), que ya ha realizado varios trabajos para diferenciar trucha arco iris del salmón del Atlántico por el método de PCR-RFLP, los *primers* utilizados fueron diseñados para la amplificación de ambas especies por PCR con el fin de someter ambos productos amplificados a la diferenciación por el corte de los fragmentos con enzimas de restricción, así mismo dicho trabajo no asegura que la utilización de dichos *primers* permitirá la amplificación de otras especies de salmón, lo cual, en un principio representa una desventaja para el objetivo planteado en este trabajo. Así pues, se procedió al diseño de *primers* como se menciona posteriormente. [7, 8, 15]

El genoma mitocondrial del salmón rey, *Onchorhynchus tshawytscha* se muestra en la **figura 4.1**. La zona de interés, que corresponde al gen *cyt b*, comprende 1141 pb, localizados del 15363 al 16503.

La selección y el diseño de *primers* se realizaron siguiendo las recomendaciones generales para el diseño y selección de *primers* señaladas en el capítulo 2. El diseño se realizó en base a la secuencia mitocondrial obtenida del Mitomap en el National Center for Biotechnology Information (NCBI)¹⁵ y se consideró en la zona del

¹⁵ www.ncbi.nlm.nih.gov

gen citocromo b, señalado anteriormente debido a su grado de conservación intraespecífica. [30, 40]

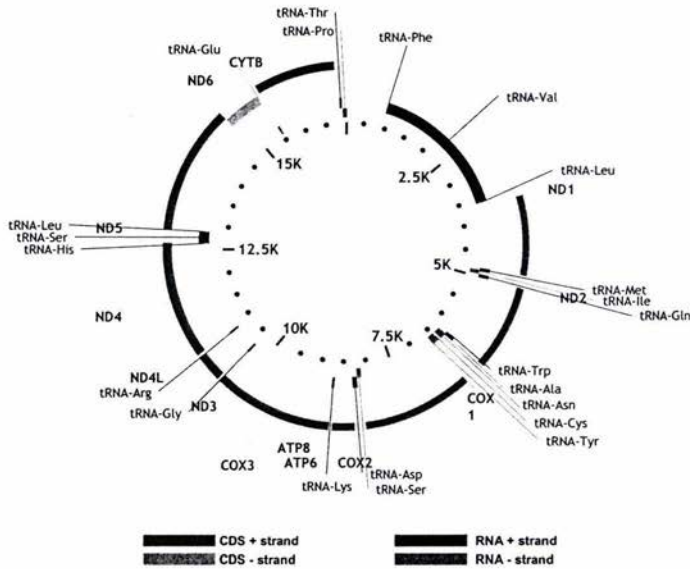


Figura 4.1 Genoma mitocondrial del salmón rey *Oncorhynchus tshawytscha*

Fuente: NCBI, 2003.

El diseño y selección de *primers* llevó a la observación del comportamiento de tres distintas secuencias de *primers*, que se muestran en la **tabla 4.1**, donde los *primers* **S (1)** y **S (2)** corresponden a la secuencia de la cadena L, los que corresponden a sitios distintos, como se puede apreciar. El *primer* señalado como **R** corresponde al seleccionado en dirección 5' a 3' para la secuencia complementaria del genoma especificado (cadena H). [4]

TABLA 4.1 SELECCIÓN Y DISEÑO DE *PRIMERS*

Nombre	S (1)
Secuencia 5' a 3'	GCT AAT GAC GCA CTA GTC GA
Posición en el genoma mitocondrial	15402 a 15421. Zona cyt b

Longitud	20 pb
Contenido de GC	50%
Contenido de AT	50 %
Temperatura de fusión	60°C
Nombre	S (2)
Secuencia 5' a 3'	GCT GCT ACA ACC AAT CCC AA
Posición en el genoma mitocondrial	15184 a 15204. Zona ND 6
Longitud	20 pb
Contenido de GC	50%
Contenido de AT	50%
Temperatura de fusión	60°C
Nombre	R
Secuencia 5' a 3'	CTG TAG CAG CTG CAA TGA CG
Posición en el genoma mitocondrial	15923 a 15942. Zona cyt b
Longitud	20 pb
Contenido GC	55%
Contenido AT	45%
Temperatura de fusión	62°C

Por tanto, se analizaron en forma práctica, dos parejas de *primers*, la primera con S (1) y R amplificando una secuencia de 541 pb, y la segunda con S (2) y R amplificando una secuencia de 759 pb.

Los *primers* fueron analizados con el fin de identificar similitudes con otras especies; esto se realizó en el programa Fasta ³¹⁶ del European Bioinformatics Institute, donde se buscaron las secuencias de DNA en el banco de datos versión 3.4t21 con fecha del 14 de mayo de 2003. Los resultados de la búsqueda muestran la afinidad entre las secuencias de los *primers* con las secuencias genómicas existentes en dicha base de datos.

Para el caso del *primer* S (1), se encontró 100% de identidad con 52 especies, entre las que se encuentran las especies de salmones, otras especies de peces de

¹⁶ www.ebi.ac.uk/fasta33

diversas familias y el caso particular de las larvas de hurta (*Pagrus auriga*), lo que implica que el *primer* no puede identificarse como *primer* especie - específico.

El *primer* S (2), en cambio, únicamente encontró 100% de identidad con 2 especies de salmón, *Oncorhynchus tshawytscha* (Salmón rey) y *Oncorhynchus gorbuscha* (Salmón rosado). La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y la trucha cutthroat (*Oncorhynchus clarki*), el salmón keta (*Oncorhynchus keta*), y la trucha lenok (*Brachymystak lenok*), la cual no pertenece a la familia de los salmónidos, tuvieron diferencias en una base, por lo que no se califican como 100% idénticos, sin embargo, mantienen una alta posibilidad de la amplificación por PCR con este *primer*.

El *primer* R fue el más específico, puesto que sólo mostró identidad con 3 especies: *Oncorhynchus tshawytscha* (Salmón rey), *Oncorhynchus gorbuscha* (Salmón rosado) y *Thalassoma newtoni* (Fredí) cuyo nombre científico válido es *Thalassoma pavo*. Este último es un pez de acuario, sin importancia comercial, de la familia: Labridae; subfamilia: corinae; clase: actinopterygii. [12]

Por principio se nota que, a pesar de la diversidad de especies que pueden contener alguna de las secuencias seleccionadas, fue posible descartar en modo teórico la amplificación de especies extrañas puesto que el programa únicamente señaló repetidamente para ambas parejas de *primers*, las secuencias de salmón rey y salmón rosado.

Aún cuando el *primer* S (2) tiene gran ventaja en especificidad sobre S (1), se decidió aplicar el análisis experimental para ambos y hacer una evaluación más profunda sobre sus perspectivas para la identificación de salmón.

4.2 EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LOS PRIMERS

En lo que confiere al objetivo particular 2, los resultados de amplificación obtenidos con los *primers* utilizado en los 4 grupos de especies planteados¹⁷ fueron los siguientes:

4.2.1 Grupo 1. Especies filogenéticamente distantes

La aplicación de la PCR a este grupo de especies, se realizó con dos fines; el primero, descartar que los *primers* mencionados sean capaces de amplificar especies de gran importancia alimentaria en nuestro país, que podrían ser usadas para adulterar los productos de salmón, aún cuando la utilización de estos *primers*, sin un método complementario a la PCR, no permita detectar adulteraciones por la mezcla de alguna de estas especies con salmón. En segundo lugar, y de modo primordial fue demostrar que los *primers* no amplifican especies filogenéticamente lejanas, es decir, que son específicos.

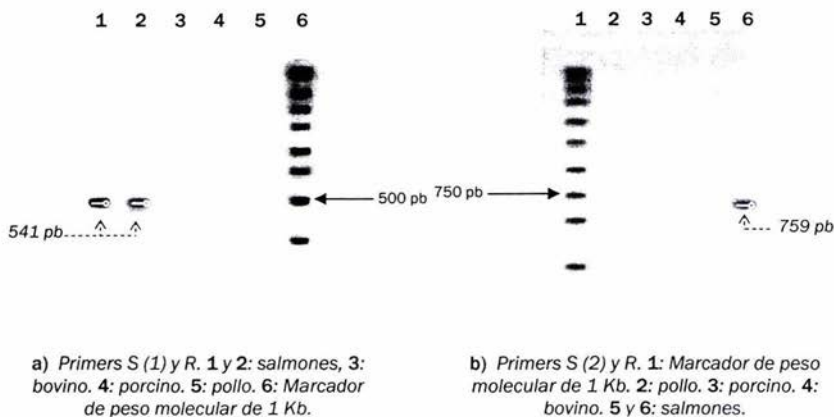


Figura 4.2 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con muestras de DNA de especies filogenéticamente lejanas

¹⁷ Grupo 1: Aves de corral, bovino, porcino. Grupo 2: Guachinango, rubia. Grupo 3: Trucha arco iris y trucha asalmónada. Grupo 4: Salmones.

Para este grupo (pollo, bovino y porcino), no existió amplificación como se muestra en la **figura 4.2,a** cuya fotografía presenta un gel de agarosa al 2% que lleva el producto de PCR con los *primers* S1 y R. Los carriles 1 y 2 corresponden a muestras de salmón fresco que presentan la banda esperada de 541 pb. Por el contrario, en los carriles 3, 4 y 5 con muestras de bovino, porcino y pollo respectivamente, no muestran banda de amplificación. De la misma forma, en la **figura 4.2,b)** se muestra la fotografía del gel de agarosa al 2% con amplificadas de PCR preparada con *primers* S (2) y R, donde los carriles 2, 3 y 4 llevan los productos de la PCR con muestras de DNA de pollo, porcino y bovino, respectivamente, los cuales tampoco han amplificado con estos *primers*. Los carriles 5 y 6 llevan los productos de PCR con muestras de DNA de salmones frescos, que muestran que la PCR aplicada ha funcionado adecuadamente, aún cuando uno de los salmones no mostró amplificado, lo que se discutirá posteriormente cuando se hable del Grupo 4. El carril 1 lleva el marcador molecular de 1 Kb.

Este resultado da la primera pauta de especificidad de los *primers*, puesto que, durante la autenticación, es importante descartar que los *primers* pudieran amplificar cualquier especie extraña que hubiese sido empacada en lugar de salmón.

4.2.2 Grupo 2. Especies de pescado filogenéticamente distantes

En este grupo se han incluido dos especies de pescados que pertenecen a una familia extraña a la familia de los salmónidos, el primero, el guachinango (*Lutjanus argentiventris*) [18], que es un pez muy conocido y cultivado en México, y el segundo, la rubia (*Lutjanus inermis*) [1].¹⁸

Las fotografías de la amplificación para estas especies se muestran en la **figura 4.3**. La imagen a) presenta los productos de la PCR preparada con *primers* S (1) y R, donde el carril 1 lleva el marcador de peso molecular de 1 Kb, el carril 2 lleva una muestra control de salmón fresco, y los carriles 3 y 4 llevan el producto de PCR

¹⁸ Para ambas especies, la familia es: Lutjanidae, orden: Perciformes, clase Actinopterygii. Nótese que la familia y orden son diferentes a los salmones, mientras que la clase es la misma (página 6).

a partir DNA extraído de rubia y guachinango respectivamente. La fotografía b) presenta los productos de PCR preparada con *primers* S (2) y R, donde los carriles 1 y 2 llevan los productos de PCR con DNA de guachinango y rubia, respectivamente. Las bandas en 3 y 4 funcionaron como control y son los productos de PCR de DNA de salmón.

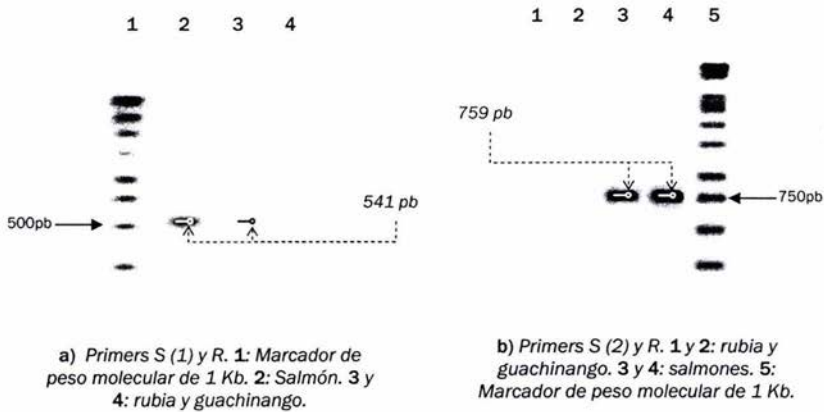


Figura 4.3 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con DNA de especies que pertenecen a otras familias de peces

En la **figura 4.3,a**, para el caso de la rubia, se visualizó una banda tenue en todas las repeticiones de la PCR (marcada en la imagen), aunque en realidad no se alcanza a notar en la fotografía, lo que demuestra un pequeño fallo en la especificidad del *primer* S (1). La presencia de banda en este caso, implica que la secuencia genómica de la rubia encuentra una baja identidad por ambos *primers*, aunque ninguno de ellos es 100% idéntico con la zona de hibridación. Cuando esto sucede, generalmente es debido a diferencias en regiones del *primer* que no son críticas (como lo serían los finales de la secuencia del oligonucleótido). Una banda tan tenue simboliza el apareamiento de los *primers* con las cadenas simples del DNA de la rubia, pero en muy bajas proporciones. Por otra parte, hay que recordar que la región amplificada del DNA mitocondrial corresponde a una zona codificante

que presenta mayor conservación (menos diferencias de secuencias) que las zonas o codificantes como la región D-loop. [29,40]

La secuencia mitocondrial del guachinango mostró ser discrepante para los *primers*, puesto que en ningún caso se visualizó alguna banda de amplificación.

4.2.3 Grupo 3. Especies filogenéticamente cercanas. Identificación de especies de la misma familia

Este grupo se conforma por dos especies de truchas, pertenecientes a la familia de los salmónidos, que potencialmente pueden ser objeto de adulteración en los productos de salmón debido a la factibilidad que presenta su cultivo en climas mexicanos y, sobretodo, su semejanza con el tejido del salmón. Las especies involucradas son la Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y la Trucha Asalmonada (*Salmo trutta morpha fario*). Cabe resaltar que para ambas especies, por formar parte de la familia de los salmónidos, su diferenciación genética es más complicada pues la diferencia en bases es mucho menor comparada con las diversas especies de salmones.

Las siguientes fotografías (figura 4.4) presentan las bandas que aparecen a partir del amplificado de DNA de truchas. En a) se expone el gel cargado con los productos de PCR preparada con *primers* S (1) y R. En esta imagen el carril 1 lleva el marcador molecular de 1 Kb, 2 y 3 llevan trucha arco iris y trucha asalmonada, respectivamente. En b) el gel muestra los productos de PCR arreglada con *primers* S (2) y R, donde 1 y 2 son productos con DNA de trucha asalmonada y trucha arco iris correspondientemente, tal y como lo muestra la figura. En este caso, no fue necesario mostrar geles con muestras de salmón amplificado, pues se ha notado con las bandas presentes representan una amplificación adecuada.

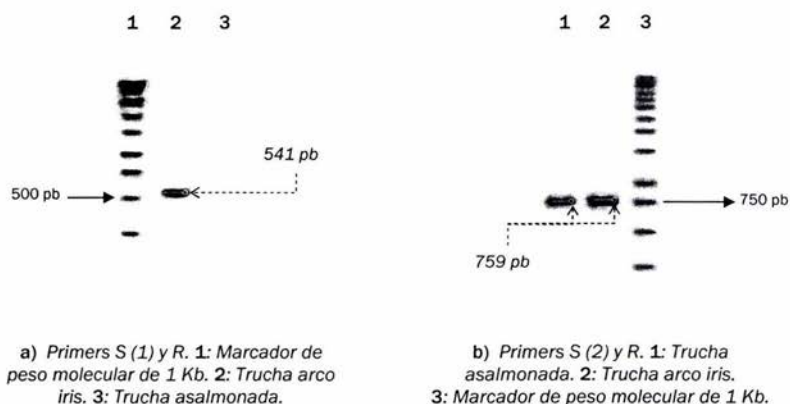


Figura 4.4 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con DNA de especies filogenéticamente cercanas

Nótese que en el caso de a) sólo existe una banda ubicada en el carril para trucha arco iris. Esta característica mejora la especificidad de la pareja de *primers* S (1) y R, pues se ha podido descartar a una especie filogenéticamente cercana al salmón y de gran importancia en este estudio con la combinación de estos *primers*. Por el contrario, S (2) y R presentan bandas bien definidas para estas dos especies, lo que implica que estos *primers* de ningún modo podrían utilizarse para la amplificación específica de salmones pues son capaces de amplificar dos especies que pueden utilizarse de modo potencial en la adulteración del salmón.

4.2.4 Grupo 4. Salmones

En este caso se involucraron dos tejidos de salmón que los vendedores no identificaron específicamente, pero que pudieron ser reconocidos por sus características fisiológicas (descritas en el capítulo 1). Las fotografías de los geles de electroforesis que soportan la amplificación por PCR de los salmones, se muestran en la figura 4.5, donde a) contiene los productos de PCR preparada con *primers* S (1) y R (región de 541 pb) y b) corresponde al producto de la PCR integrada con *primers* S (2) y R (región de 759 pb). En la imagen a), el carril 1 lleva el amplificado de DNA de una especie de salmón que se identificó con el

seudónimo 'FRESCO X', mientras que el carril 2 lleva el amplificado del DNA de la segunda especie de salmón nombrado 'FRESCO Y'. En el carril 3 aparece el marcador de peso molecular de 1 Kb. En b), el carril 2 lleva el producto de la amplificación del DNA de 'FRESCO Y', mientras el carril 3 corresponde a 'FRESCO X'.

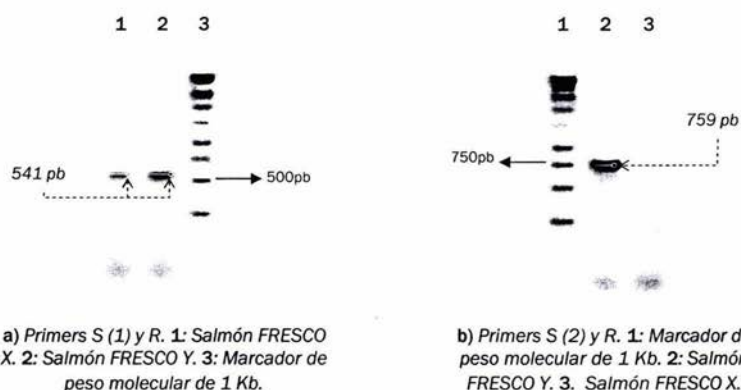


Figura 4.5 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con DNA procedente de salmones

La pareja de *primers* S (2) y R en b) mostró un resultado poco específico para salmón, ya que de las dos muestras utilizadas sólo amplificó una de ellas, lo que no es recomendable cuando se están diseñando *primers* que permitan asegurar la presencia de esta especie. En cambio, *primers* S (1) y R en a) demuestran una habilidad mayor para amplificar DNA de especies diversas de salmón.

Así pues, el diseño de un protocolo que utiliza *primers* especie-específicos para la autenticación de especies en productos comerciales, recae principalmente en la selección de *primers* que se caractericen por tener especial afinidad con las especies deseables y, en la medida de lo posible, la menor afinidad por especies de familias extrañas y especies que, por sus características morfológicas, puedan ser objeto de adulteración. Los *primers* hasta aquí estudiados han demostrado sus habilidades en modo práctico (amplificación *in vitro*), dejando atrás el diseño y afinidad que, en teoría, mantienen con las especies.

En un principio, ambas parejas de *primers*, demostraron su habilidad para descartar la falsificación del salmón con tejidos musculares provenientes de especies en alto grado comestibles y con valiosos volúmenes de producción, que es el caso del pollo, porcino y bovino.

La pareja de *primers* S (1) y R, aunque mostró capacidad para amplificar especies de peces de familias lejanas, como es el caso de la rubia (*Lutjanus inermis*), la calidad del amplificado es muy baja, por lo que el caso puede despreciarse. Por otro lado, la habilidad para distinguir las especies de trucha descartando a la trucha asalmonada (*Salmo trutta morpha fario*), hace de esta pareja la más adecuada para el protocolo pues, además, es competente en la amplificación indiscriminada de salmones. No así para la segunda pareja de *primers*, que involucra el *primer* S (2) pues, aunque este *primer* teóricamente expone mayor especificidad a la familia de los salmones, en combinación con R ha podido amplificar el DNA de ambas truchas y ha discriminado especies de salmones, lo que no es adecuado para el protocolo.

Aún con esto, no se ha podido diferenciar al salmón de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), por lo que se consiguieron muestras auténticas de salmón del atlántico (*Salmo Salar*) que es la especie mayormente procesada y comercializada en México, y se buscó su amplificación con ambas parejas de *primers*, esperando resultados satisfactorios, con lo que se plantearía una nueva forma de diferenciar ambas especies.

Los resultados se muestran en la **figura 4.6**, donde **a)** muestra los productos de PCR utilizando la primera pareja de *primers* (S (1) y R), y **b)** con la segunda (S (2) y R), ambas reacciones acondicionadas para la amplificación de Salmón del Atlántico. En ambos casos, se visualizó banda en el sitio correspondiente, sin embargo, para la pareja de *primers* S(2) y R, la banda es demasiado tenue y no se alcanza distinguir.

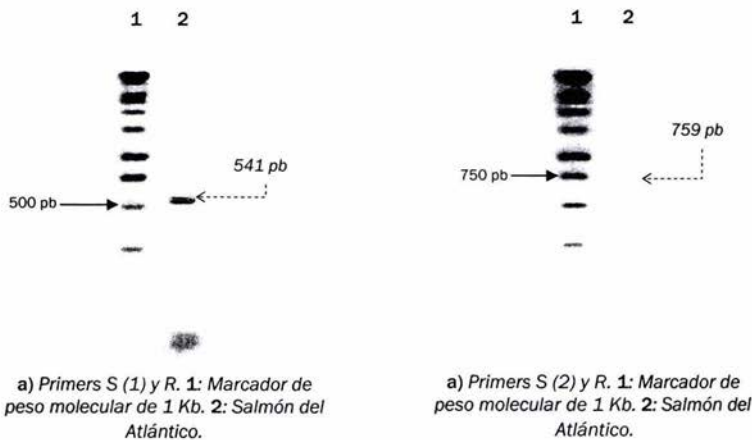
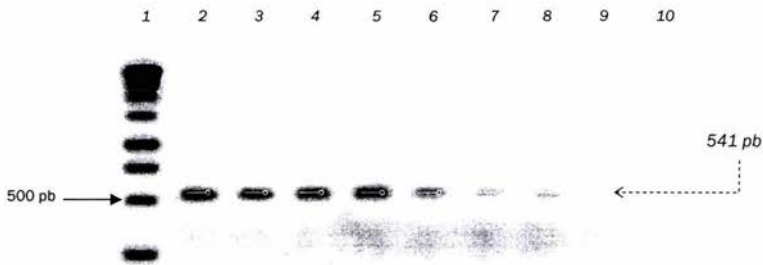


Figura 4.6 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con DNA de salmón del Atlántico

La aptitud de los *primers*, evaluada en este caso, apoya la determinación de utilizar la primera pareja de *primers* en el protocolo de autenticación.

4.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS PRIMERS PARA AMPLIFICAR SALMÓN PROCESADO TÉRMICAMENTE

Debido a que el DNA se degrada con el aumento de temperatura, se ha evaluado la habilidad de los *primers* para amplificar productos derivados de tratamientos térmicos. El resultado de esta prueba se muestra en la figura 4.7, que expone la electroforesis en gel de agarosa, para las muestras procesadas a diversas temperaturas. En la fotografía, el carril 1 presenta al marcador de peso molecular de 1 Kb. Carriles 2 al 5 contienen los productos amplificados por PCR con DNA extraído de tejidos procesados a 40, 60, 80 y 92°C, como se explica en el capítulo 3, así mismo, los carriles 6 al 10 soportan los productos amplificados por PCR aplicado al DNA de tejidos sometidos a temperatura de esterilización, 121°C por 2 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos y 10 minutos, respectivamente.



Primers S (1) y R. 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb. 2: 40°C. 3: 60°C. 4: 80°C. 5: 92°C. 6: 121°C, 2". 7: 121°C, 1 min. 8: 121°C, 2 min. 9: 121 °C, 5 min. 10: 121°C, 10 minutos.

Figura 4.7 Electroforesis en gel de agarosa al 2% Productos de PCR con DNA de salmón del Atlántico procesado a diferentes temperaturas

La fotografía del gel muestra una serie de bandas alineadas, es decir, con tamaños uniformes, éstas además muestran la peculiaridad de ir disminuyendo su intensidad conforme la temperatura y tiempo de procesamiento aumentan, debido a la degradación del DNA. Sin embargo, aún se pueden obtener fragmentos de DNA de más de 540 pb cuando el tejido se ha procesado por 5 minutos a 121°C. Desgraciadamente el intervalo entre 5 y 10 minutos es muy amplio y no se puede distinguir hasta qué temperatura y tiempo se puede amplificar un fragmento de tamaño suficiente. Aún con esto, si se quisiera amplificar salmón procesado fuertemente, bastaría con rediseñar un *primer* que delimitara un fragmento más corto dentro de la zona del gen *cyt b* pues, como menciona Bossier, el DNA de tejidos con fuerte proceso térmico (esterilización) tiene un rango de 300 pb. No obstante, el fragmento diana debe ser suficientemente apto para detectar la autenticidad de productos con esterilización comercial, donde se utiliza un rango de 5 a 7 minutos de proceso a 121°C. [6,31]

Mientras, el protocolo propuesto es suficientemente apto para cualquier otro tipo de proceso térmico, como el blanqueado, escaldado, pasteurización, e incluso congelación, aun cuando implique su aplicación en productos de otra índole.

4.4 PLANTEAMIENTO DEL PROTOCOLO DE AUTENTICACIÓN

Tras los resultados obtenidos, el protocolo para la autenticación de productos de salmón, con la aplicación de PCR, se basa en el empleo de los componentes de la reacción de amplificación, tal y como se menciona a continuación:

La extracción del DNA de los productos a autenticar se debe llevar a cabo como se presenta en el capítulo 3, en el apartado correspondiente a Métodos (Extracción de DNA). La reacción debe ser preparada de acuerdo a lo que se menciona en el mismo apartado (Amplificación de DNA), obedeciendo las concentraciones indicadas. Los *primers* más adecuados, diseñados en este trabajo, para la autenticación de productos de salmón deben cumplir con las características que se refieren en la **tabla 4.2**. Las condiciones de amplificación de estos *primers*, durante la PCR, convienen ser las expuestas en la **figura 3.2**.

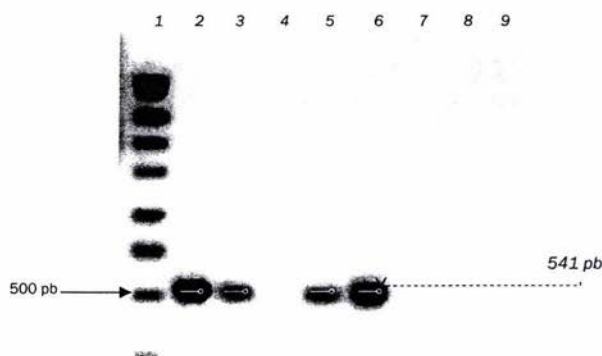
TABLA 4.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS *PRIMERS* DISEÑADOS PARA AUTENTICAR PRODUCTOS DE SALMÓN

	<i>PRIMER 1</i>	<i>PRIMER 2</i>
Nombre	S (1)	R
Secuencia 5' a 3'	GCT AAT GAC GCA CTA GTC GA	CTG TAG CAG CTG CAA TGA CG
Posición del genoma	15402 a 15421. Zona cyt b	15923 a 15942. Zona cyt b
Longitud	20 pb	20 pb
Contenido de GC	50%	55%
Contenido de AT	50 %	45%
Temperatura de fusión	60°C	62°C
Longitud de la banda amplificada	541 pb	

4.5 AUTENTICACIÓN DE PRODUCTOS DE SALMÓN

La autenticación de los 6 productos de salmón propuestos, se llevó a cabo utilizando el protocolo ya planteado. Los resultados de esta amplificación se muestran en la figura 4.8.

En la imagen, el carril 1, presenta al marcador molecular de 1 Kb, los carriles 2 y 6, llevan los amplificados de DNA de muestras de salmón fresco. Los carriles 3, 4 y 5, llevan los salmones ahumados, el primero, marca Kea Light, el segundo, Delfish Ltda., y por último, Aguas Claras. Los carriles 7 y 8 llevan los productos de PCR con DNA de salmón ahumado usado como relleno en aceitunas, el carril 7 corresponde al producto marca Jolca, y el 8 al producto marca La Española. Por último, el carril 9 lleva el producto de PCR con DNA extraído de salmón enlatado marca Brunswick.



Primers S (1) y R. 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb. 2: Salmón FRESCO X. 3: Salmón del Atlántico ahumado Kea Light. 4: Salmón del Atlántico ahumado Delfish Ltda. 5: Salmón del Atlántico ahumado Aguas Claras. 6: Salmón FRESCO Y. 7: Salmón en aceitunas Jolca. 8: Salmón en aceitunas La Española. 9: Salmón rosado enlatado Brunswick.

Figura 4.8 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Productos de PCR con DNA de productos de salmón

El DNA proveniente de productos enlatados, como es el caso las aceitunas rellenas de salmón y el salmón enlatado, no fue diana en la amplificación. En el caso del

salmón ahumado en aceitunas puede ser simplemente que, tras un doble procesamiento, realmente no existan fragmentos de DNA apropiados para la detección por este protocolo, aunque el color del tejido del salmón en estos productos difiere mucho entre uno y otro, pues, mientras uno es de color blanquecino, el otro presenta un color anaranjado que parece que se ha teñido y, además, difieren del color característico del salmón ahumado, lo que implica que es muy probable que no sea salmón auténtico.

Los productos ahumados de marca Kea Light y Aguas Claras, ante esta prueba pueden declararse auténticos, salvo que sean falsificados con Trucha Arco iris, sin embargo, el producto ahumado marca Delfish Ltda. se califica como producto adulterado pues el DNA extraído no ha sido blanco de la amplificación.

4.6 DESARROLLO DEL PROTOCOLO PARA RFLP

Tras los resultados obtenidos, se hizo necesaria la distinción entre las especies de salmón y la trucha arco iris, puesto que los productos que aparentan ser auténticos, podrían no serlo.

El desarrollo de este protocolo permitirá, además de distinguir entre estas dos especies, detectar la mezcla de salmón con trucha arco iris, mostrando perfiles electroforéticos particulares tras la digestión con enzimas de restricción.

Para plantear el protocolo, se recurrió a la secuenciación automática de los productos de PCR para ambas especies (*Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss*) para la región de 541 pb, posteriormente se analizaron las secuencias con dos programas bioinformáticos, Chromas Pro 1.13 7 y Redasoft Visual Cloning 3.0, identificando los sitios de restricción en los fragmentos secuenciados de cada especie, así como sus perfiles de digestión con cada enzima. Los resultados de estos procedimientos se muestran a continuación.

4.6.1 Secuenciación automática

Los productos de PCR purificados con Exo-SAP-IT, fueron secuenciados en un secuenciador modelo 3100 Genetic analyzer con química de DNA ABI Prism BigDye Terminator chemistry, movilidad DT3100pop6(BD)v2, en capilar de 50cm. La secuenciación se llevó a cabo en ambos sentidos utilizando los mismos *primers* de amplificación que señala el protocolo.

Los electroferogramas resultantes se muestran en el anexo 1. Las secuencias son las siguientes¹⁹:

- ▮ Para el salmón del atlántico, secuenciado con el *primer* S (1): (448 nt reportados)

```
14516 cct tac cgg gct ctt cct agc cat aca cta cac ctc
    cga tat ctc aac agc ttt ttc ctc tgt ttg cca cat ttg cgg
    aga tgt tag cta tgg ctg act cat cgg taa cat tca cgc taa
    cgg agc atc ttt ctt ctt tat ctg tat tta tat aca cat cgc
    cgg agg act tta tta tgg ttc cta tct ata taa aga aac ctg
    aaa tat cgg agt tgt act tct act tct cac tat aat aac tgc
    ctt cgt agg cta cgt tct tcc atg agg aca aat atc ctt ctg
    agg agc cac tgt aat tac aaa cct cct ctc cgc tgt ccc cta
    cgt agg agg cgc cct tgt aca atg aat ttg agg agg att ttc
    tgt aga caa cgc cac cct aac acg att ttt cgc ctt cca ctt
    cct att ccc att cgt cat tgc agc tgc tac aga a 14963
```

- ▮ Para el salmón del atlántico, secuenciado con el *primer* R: (515 nt reportados)

```
14420 ctc cgg gan tac ngg cgc naa tgg tgt cta ggt ggc
    gtt gtc tac aga aaa tcc tcc tca aat tca ttg tac aag ggc
    gcc tcc tac gta ggg gac agc gga gag gag gtt tgt aat tac
    agt ggc tcc tca gaa gga tat ttg tcc tca tgg aag aac gta
    gcc tac gaa ggc agt tat tat agt gag aag tag aag tac aac
    tcc gat att tca ggt ttc ttt ata tag ata gga acc ata ata
    aag tcc tgg ggc gat gtg tat ata aat aca gat aaa gaa gaa
    aga tgc tcc gtt agc gtg aat gtt acg gal gag tca gcc ata
    gct aac atc tgg gca aat gtg gca aac aga gga aaa agc tgt
    tga gal atc gga ggt gta gtg tal gcc tag gaa gag ccc ggt
    aag gal ttg ggt ggc tag aca tag gcc taa gag tga gcc aaa
    gtt tca tca aac tga gal gtt aga tgg tgc tgg gag atc gac
    tag tgc gtc att agc at 14914
```

¹⁹ El número que presentan las secuencias en sus extremos, corresponde a la posición en el genoma, resultados dados por fasta 3.

■ Para la trucha arco iris, secuenciada con el *primer S* (1): (643 nt reportados)

```

15473 ang ggn gct ntt nnt att tan ntt ttt gtn aat tgt
lng nct ntc nnt gnt ctc gcc ntt ntg ana gnt cat atg atg
ttt ccc tgc get nag gga aaa agn cta tgt ttc cct acc caa
ant gaa aac ngg gct ctt cct agc tca tgc act aat acc tgc
ttt tta ttn cca cag ctt tnn een nag ttt gcc aca tct gcc
gag atg tta gtt ang gng ggn ggg ggn ngg ana cat eng
ggg nnn cgg agc atc ttt ctt ttt tat ctg tat tta tal aca
tal tgc ccg agg act tta ata cgg ttc gla cct cta nta aga
aac ctg gaa tat cnn agt tgt act ttt act tct caa tta tta
ana act gcc ttn tgt ang nta cgt nat can gtg agg aac aaa
tnl cat tct gan ggg aca ntt gtt nat tac aaa tnt cca tct
cag ctg tat ntt ann nec gen cgc enc ttt att tca atg naa
ttg agg ggn ctt ctt eng ttg ten ten nca aan naa ana ngg
att ttt ccc ctt ttc act atn nta tnt nnc nat ttn ntt tat
tnn can eng cna eng atc ntn ntc ctt ncn acc nct ccc
ttt nac tct ctt nct tnc ntt tnt t 15826

```

■ Para la trucha arco iris, secuenciada con el *primer R*: (599 nt reportados)

```

15400 etc ttc tat nnn nnt nnn nna ggn nnn nnn ntg enn
ggt tct aaa gtg ccc cac cat ggn cta gag gcg tgg ana cgg
aga nnt ccc tca aat ten nng aan tag gcc gcc tcc tac
gta ggg tac agc tga lng gag ncn tgl aat tac agt ggn nec
tca gaa tga tat ttg tcc tca cgg gag gan gna gcc tac taa
ggc agt tan nan agt gag aat aaa agt cca act ccg ata ttc
cag gtt tct ttg tag agg tac gag ccg tag taa agt cct cgg
gcg ata tgl atn taa ata cng ata aaa aag aaa gat gct cgg
ttg gca tgg atg ttt cna atg ant enn ccg taa ctn aca tct
cgg cca gat gtg gcc aac aga gga gaa ant tnt ttg aaa tgt
cng agg tat agt gca lgn ccc ccc cca nec cgg ntn ana
att tgg gna gct aaa cat acg cct agt tan ttg aag cca aan
nnn nat cac ant gen cnt att ana agg tgc ttg ggn ngt
cna cta gtg cct nat tag cna acn nnc ctn ngc nnc tnt
ncc ctn enc tnc tcc tta etc gla ntg nn 15884

```

La secuenciación del DNA amplificado y purificado para trucha, muestra una serie de n's, que representan nucleótidos que no pudieron ser leídos por el secuenciador, por lo que pueden simbolizar cualquier nucleótido en esta representación, sin embargo, en la realidad para cada sitio existe un nucleótido específico que, por el momento, se desconoce. Este resultado complicó en cierto grado el desarrollo del protocolo RFLP. Para solucionarlo, fue necesario recortar la zona para el análisis de sitios de restricción, en función a la secuencia de trucha

arco iris. La región seleccionada, carente de n's es la siguiente (72 nt), el electroferograma correspondiente al fragmento se presenta en la **figura 4.9**.

15616 cg gag cal ctt tct ttt tta tct gta ttt ata tac ata
ttg ccc gag gac ttt aal acg gtt cgt acc tct a 15687

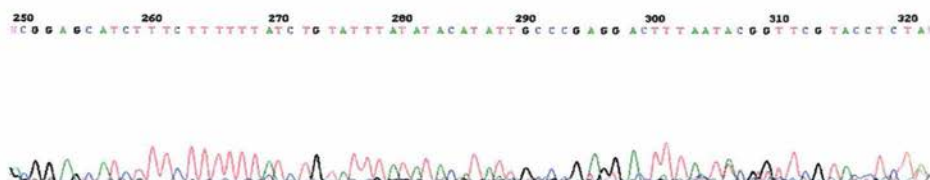


Figura 4.9 Electroferograma de la secuenciación automática. Fragmento correspondiente a la selección para trucha arco iris

En función a dicha secuencia, la correspondiente para salmón del atlántico es la siguiente secuencia, el electroferograma correspondiente a este fragmento se presenta en la **figura 4.10**.

14636 cgg agc atc ttt ctt ttt tat ctg tat tta tat aca cat
cgc ccg agg act tta tta tgg ttc cta tct ata 14707

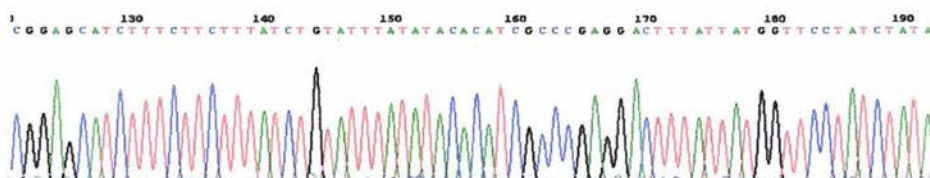


Figura 4.10 Electroferograma de la secuenciación automática. Fragmento correspondiente a la selección para salmón del Atlántico

Es en estas zonas donde se llevó a cabo el posterior análisis de sitios de restricción para la selección de endonucleasa específica.

4.6.2 Análisis de sitios de restricción

El análisis de los sitios de restricción para ambas secuencias se llevó a cabo en ChromasPro, este programa involucra alrededor de 250 enzimas de restricción. La **figura 4.11,a** muestra el mapa de restricción dado, analizado con todas las

enzimas de restricción, para salmón del Atlántico, mientras que b) muestra el mapa de restricción para trucha arco iris.

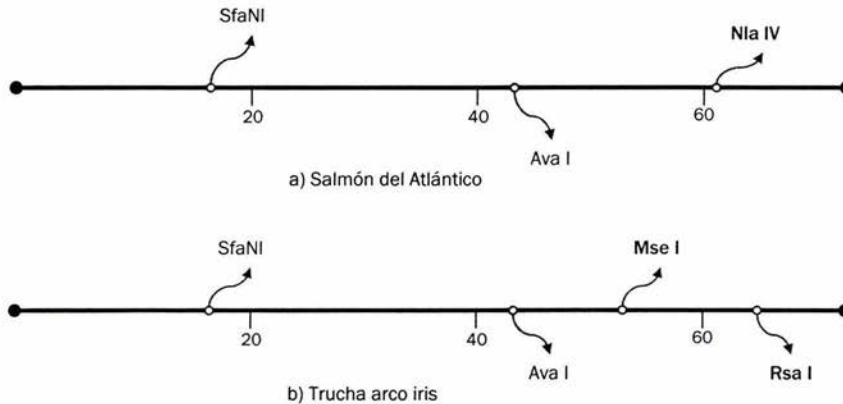


Figura 4.11 Mapas de restricción para ambas secuencias, región de 72 pb

Ambos mapas de restricción son sumamente parecidos, sin embargo, ambos difieren en algunas enzimas puesto que, mientras Nla IV corta al salmón en el sitio 62 de la región, no corta en ningún sitio de la misma región en trucha arco iris, por el contrario, MseI corta en el sitio 53 de la región en trucha arco iris sin encontrar el sitio en salmón del atlántico, así como Rsa I en el sitio 65.

Al analizar estas enzimas con más detalle, se encontró que, para la enzima Nla IV, haría 3 cortes a lo largo de toda la secuencia de Salmón del Atlántico amplificada por PCR (figura 4.11,a) produciendo cuatro fragmentos de 48, 111, 181 y 242 pb. Por otro lado, no corta en sitio alguno la secuencia de la trucha arco iris.

La enzima Rsa I, que sólo encontró un sitio de restricción en el fragmento seleccionado para trucha arco iris se analizó en el mismo software para las secuencias completas amplificadas y se encontró que dicha enzima es capaz de encontrar varios sitios de restricción en las secuencias de ambas especies (figura 4.12). Así, sin embargo, produciría perfiles distintos en su aplicación pues, mientras

que en salmón produciría tres fragmentos de 34, 295 y 314 pb (posición de los sitios de restricción: 219 y 348), en trucha produciría tres fragmentos de 129, 219 y 234 pb (posición de los sitios de restricción: 314 y 346).

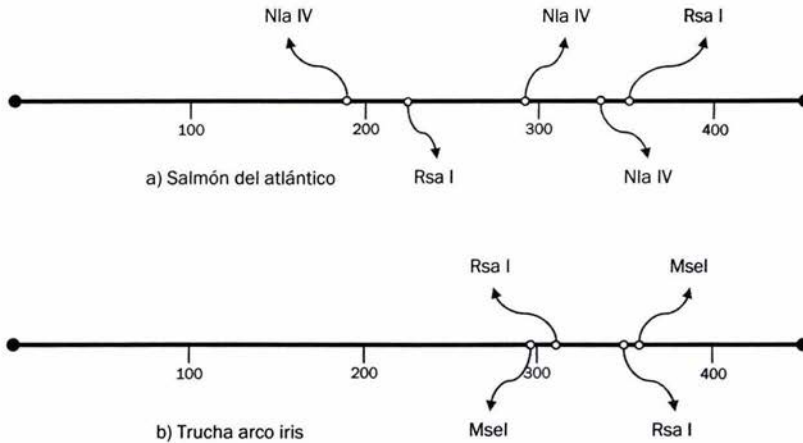


Figura 4.12 Mapas de restricción para enzimas de interés, región amplificada completa

Por otro lado, el caso de *MseI* se presenta ventajoso, pues tal enzima no halla ningún sitio de restricción en la secuencia de Salmón del Atlántico (figura 4.12, a) mientras que en trucha arco iris encuentra sólo dos sitios, el primero en el sitio 287 y el segundo en el sitio 353, lo que originaría tres fragmentos de 66, 275 y 302 pb.

Tales resultados muestran que la utilización de la enzima *MseI* se muestra más conveniente para la diferenciación de ambas especies, especialmente debido a que es capaz de fraccionar únicamente a la secuencia de trucha y no así en salmón, lo que implica que, al llevar a cabo de modo experimental el RFLP con *MseI*, cualquier amplificado de PCR se identificará como auténtico de salmón siempre que el fragmento permanezca intacto después de la aplicación de la enzima en las condiciones adecuadas, si por el contrario, se detectan fragmentos de menor tamaño en un gel de electroforesis, el resultado claramente indicaría que la especie no es auténtica (figura 4.13).

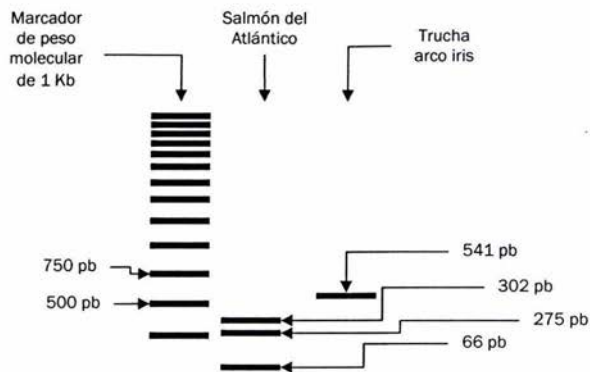


Figura 4.13 Perfil electroforético del RFLP planteado con MseI para muestras de salmón del Atlántico y trucha arco iris

Las tres enzimas analizadas, por tanto, se muestran idóneas pues, mientras que Mse I y Nla IV implican la fragmentación de sólo una de las dos especies en cuestión, la enzima Rsa I mostraría un perfil considerablemente diferible para ambas especies, puesto que cortaría a las dos especies en distintos sitios. Por otro lado, si bien es cierto que los geles de agarosa son adecuados para identificar fragmentos de 50 a 20,000 pb la resolución del DNA se reduce en los extremos de dicho rango, así, los geles de poliacrilamida son adecuados para diferenciar bandas hasta por 1 base en longitud, y se recomiendan cuando se desean examinar bandas de 5 a 500 pb. La utilización de poliacrilamida en lugar de agarosa facilitaría para reconocer con certeza el perfil electroforético resultante de un RFLP, sobre todo en el caso de la utilización de Rsa I, aunque esta situación también implica el uso de un marcador de peso molecular de tamaños menores. [40]

Conclusiones

La autenticación de alimentos a partir de pruebas que implican el análisis de alimentos a nivel genómico se ha hecho posible utilizando como herramienta principal la reacción en cadena de la polimerasa. Aún cuando el método principal está basado en la detección de fragmentos de DNA amplificados por PCR mediante el diseño y selección de *primers* específicos, cabe la complementación con un análisis de polimorfismos de restricción con endonucleasa, que puede identificar resultados inespecíficos desde la aplicación de la PCR.

La autenticación de salmones basada en el diseño de *primers* específicos de las especies para su utilización en el sistema de la reacción en cadena de la polimerasa, ha requerido el análisis de la secuencia de dichos *primers* desde diversos puntos de vista, tanto desde sus características y conformación, como desde su semejanza con otras especies, la cual teóricamente debiera ser lo más restringida posible de acuerdo con los resultados arrojados por el objetivo particular 1. En este sentido y de acuerdo con el objetivo particular 2, los resultados experimentales para los *primers* analizados y propuestos han demostrado que una alta especificidad no siempre es lo más conveniente pues pueden llegar a amplificar especies inconvenientes, mientras que excluyen la amplificación de especies de importancia específica, como se presentó con la segunda pareja de *primers*, con la inclusión de las truchas analizadas y la exclusión de los salmones. Sin embargo, *primers* cuya identidad se presentó para un mayor número de especies piscícolas, se mostraron altamente convenientes por incluir diversas especies de salmones y excluir al menos una de las truchas.

Haciendo referencia al tercero y cuarto objetivos particulares, la metodología de autenticación de especies de salmones propuesta, cuya base es la utilización de los *primers* seleccionados y diseñados en el presente trabajo ha resultado ser útil para la identificación de adulteraciones en productos procesados, principalmente en los productos ahumados, y no, de manera precisa, para los productos enlatados

que se someten a procesos térmicos mucho más duros, aún cuando se ha demostrado que la técnica es confiable cuando el proceso ha durado menos de 10 minutos a 121°C.

Los productos que han mostrado banda de amplificación por el método propuesto, no pueden considerarse 100% auténticos, puesto que la trucha arco iris sigue siendo diana de amplificación por PCR con los *primers* seleccionados, sin embargo, dando resultado al objetivo particular 5, se ha propuesto la utilización de una enzima de restricción que corte a una de las hebras de DNA por la existencia de polimorfismos entre una y otra secuencia, utilizando como base al salmón del Atlántico, que es la especie de salmón más importante en nuestro país.

Dado que la amplificación se ha dirigido en el DNA mitocondrial a la región codificante del gen *cyt b*, se ha demostrado que tanto este DNA como la región elegida han sido objeto confiable para llevar a cabo este tipo de análisis pues, como se ha apuntado anteriormente, el DNA mitocondrial presenta importantes ventajas sobre el DNA nuclear, principalmente por el alto número de copias y la ausencia de regiones no codificantes (intrones), mientras que la región del gen *cyt b* permite la definición de especies, por las valiosas diferencias inter específicas y, al mismo tiempo, por ser una región conservada intraespecíficamente, lo cual toma gran importancia en el diseño de *primers* y RFLP.

Con el presente trabajo experimental se ha constatado la utilidad del análisis del DNA mitocondrial para identificar y diferenciar especies en nuestro país, lo cual no sólo es significativo como propuesta para la autenticación de salmón en productos que se ofrecen en México, sino que, tras conocer las ventajas que presenta la utilización del DNA mitocondrial y los métodos que permiten analizarlo, este estudio puede ser utilizado como base para el planteamiento de nuevos proyectos de autenticación de alimentos.

La realización de este proyecto, que implica la adaptación de una técnica (PCR) para el planteamiento y desarrollo de un protocolo completo, proporciona un material de gran utilidad para revelar la autenticidad de salmones frescos y de

productos procesados cuya etiqueta declara que contienen salmón. Dicho material puede ser ampliamente aprovechado por la cadena productora de salmón, en su totalidad, puesto que los filetes, carentes de las características morfológicas del pez que provienen, pueden ser confundidos con otro tipo de pescados de menor valor nutritivo o cuya composición química puede no ser la más adecuada para el procesamiento al que desean someterse. Así pues, puede utilizarse como herramienta de auditoría por parte de las empresas procesadoras de salmón hacia sus proveedores de materia prima y distribuidores de salmón procesado.

Referencias consultadas

1. Allen, G. R. 1985. FishBase. Publicación electrónica en World Wide Web. www.fishbase.org, versión (10/2003). Accesado en Noviembre de 2003.
2. Bannerman, A. y Horne, J. *Recommendations for the Preparation of Smoked Salmon*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. FAO – SIFAR. 2001.
3. Bardach, J. E. et.al. *Acuicultura. Crianza y Cultivo de Organismos Marinos y de Agua Dulce*. México, AGT, 1986. 741 pp.
4. Bernal, S.O., et. al. The Complete Nucleotide Sequence of the Mitochondrial DNA Genome of Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. Sin publicar. Revisado y divulgado por NCBI. Julio, 2001. www.ncbi.nlm.nih.gov. Accesado en Junio de 2003.
5. Bratt, L. El Tratamiento Térmico. *Enlatado de Pescado y Carne*. España, Acribia, 1999. 336 pp.
6. Bossier, P. Authentication of Seafood Products by DNA Patterns. *Journal of Food Science*. (64), 2. 189-193. 1999.
7. Carrera, E. et. al. PCR-RFLP of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase Gene: A Simple Method for Discrimination Between Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79, 1654-1658. 1999.
8. Carrera, E. et. al. Salmon and Trout Analysis by PCR-RFLP for Identify Authentication. *Journal of Food Science*. (64), 3, 410-413. 1999.
9. Chávez, M.C. *La Nutrición y Alimentación en la Acuicultura de América Latina y El Caribe*. México, Centro Regional de Investigación Pesquera. Instituto Nacional de la Pesca, México FAO. Julio, 1993.
10. Étienne, J. *Bioquímica Genética, Biología molecular*. 3ª. Edición. España, Masson, 2001. 491 pp.
11. FAO Fisheries Department, Fishery Information. Data and Statistics Unit. www.fao.org Accesado en Octubre de 2003.
12. Gomon, M. F. y P. Forsyth. 1990. Publicación electrónica en World Wide Web. www.fishbase.org, versión (10/2003). Accesado en Noviembre de 2003.
13. Haard, N. The Role of Enzymes in Determining Seafood Color, Flavor and Texture. *Safety and Quality Issues in Fish Processing*. Inglaterra, CRC Press, 2002.

14. Hargin, K.D. Measurement of the Fish Content in Fish Products. *Seafoods-Quality, Technology and Nutraceuticals Applications*. Reino Unido, Springer, 2002. 224 pp.
15. Hold, G.L, et.al. Development of a DNA Based Method Aimed at Identifying the Fish Species Present in Food Products. *Journal of Food Chemistry*. (49), 3, 1175 -1179. 2001.
16. Horner, W.F.A. Conservación del Pescado Mediante Curado (Secado, Salazón y Ahumado). *Tecnología del Procesado de Pescado*. España, Acribia, 2001. 35-77.
17. Hurst, C.D. et.al. The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Atlantic Salmon, *Salmo Salar*. *Gene*. **239**, 237-242. 1999.
18. IGFA, 2001. Publicación electrónica en World Wide Web. www.fishbase.org, version (10/2003). Accesado en Noviembre de 2003.
19. Kietzman, U. *Inspección Veterinaria de Pescados*. España, Acribia, 1974. 326 pp.
20. Ladish. et. al *Molecular Cell Biology*. 4ª. Edición. Media Connected, EUA, 2002. 332-337.
21. Lockley, A.K. y Bardsley, R.G. DNA Based Methods for Food Authentication. *Trends in Food Science and Technology*. **11**, 67-77. 2000
22. Luque, J. y Herraiez, A. *Biología Celular e Ingeniería Genética*. Madrid, España, Harcourt, 2001.
23. Mackie, I.M. et.al. Challenges in the Identification of Species of Canned Fish. *Trends in Food Science and Technology*. **10**, 99-114.1999
24. Mackie I.M. Métodos de Identificación de Especies de Pescado Fresco y Procesado. *Tecnología del Procesado del Pescado*. España, Acribia, 2001. pp 169-208.
25. Martínez S, et.al. Alternativas de Diseño de una Granja de Truchas: Volumen de Producción y Número de Lotes Anuales con Dos Perfiles de Temperaturas. *AquaTIC*, **19**, Julio-Diciembre 2003. [Disponible el 01/03/2004 en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=169>] Accesado en Octubre de 2003.
26. Métodos de Identificación de especies Animales en Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. www.ucm.es/info/complutecno/fichas
27. Meyer, R. y Candrian, U. PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **29**, 1-9. 1996.

28. Miler, K. B. M. y Sikorski, Z. E. Ahumado. *Tecnología de los productos del mar: Recursos, Composición Nutritiva y Conservación*. España, Acribia, 1994. 223-245.
29. Montiel, J.F. et.al. Detection of Pork Meat and Fat in Meat Products by PCR Amplification of Mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **7**, 2829-2832. 2000.
30. Montiel, J.F. *Variabilidad Genética del Clado Mitocondrial y Astenozoospermia Humana*. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, España, 2002. 193 pp.
31. Naczk, M. et. al. Enlatado. *Tecnología de los Productos del Mar: Recursos, Composición Nutritiva y Conservación*. España, Acribia, 1994. 249-270.
32. Page, L.M. y B.M. Burr. 1991. Publicación electrónica en World Wide Web. www.fishbase.org, versión (10/2003). Accesado en Noviembre de 2003.
33. Popping, B. The Application of Biotechnological Methods in Authenticity Testing. *Journal of biotechnology*. **98**, 107-112. 2002.
34. Quinteiro, J. et. al. Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR-Restriction Fragment Polymorphism Methodologies in Species Identification of Canned Tuna. *Journal of Agricultural and food Chemistry*. **46**, 1662-1669. 1998.
35. Rehbein, H. et. al. Application of PCR-SSCP to Species Identification of Fishery Products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **74**. 35-41. 1997.
36. Rehbein, H. et.al. 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. 1999.
37. Rehbronn, E. y Rutkowsky, F. *Ahumado de Pescados*. España, Acribia, 1989. 134 pp.
38. Russell, V.J. et.al. Use of Restriction Fragment Length Polymorphism to Distinguish Between Salmon Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**, 2184-2188. 2000.
39. Salmón Ahumado. Norma mexicana NMX-497-1994-SCFI. www.economia.gob.mx. Accesado en Mayo de 2004.
40. Sambrook, J. y Russel, D. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. EUA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
41. Senser, F, Scherz, H. *Tablas de composición de alimentos*. 2ª. Edición. España, Acribia, 1999. pp 202, 204

42. Sikorsky, Z.E. et. al. Composición Nutritiva de los Principales Grupos de Organismos Alimenticios Marinos. *Tecnología de los Productos del Mar: Recursos, Composición Nutritiva y Conservación*. España, Acribia, 1994. 330 pp.
43. Sotelo, C.G. y Pérez-Martín, R.I. Species Identification in Processed Seafoods. *Safety and Quality Issues in Fish Processing*. Inglaterra, Woodhead Publishing Limited. 2002. pp 450 - 474.
44. Svetovidov, A. N. 1984. Publicación electrónica en World Wide Web. www.fishbase.org, versión (10/2003). Accesado en Noviembre de 2003.
45. Trucha Ahumada. Norma mexicana NMX-F-548-1996. www.economia.gob.mx. Accesado en Mayo de 2004
46. Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiología, España. Especies piscícolas. www.infecipi.unizar.es/pages/piscis. Accesado en agosto, 2003.
47. Universidad Nacional de Colombia (programa universidad virtual). Especies piscícolas. www.virtual.unal.edu.com/cursos/agronomia/2006228/teoria/fundam/p5.htm. Accesado en marzo de 2004.
48. Wegrzyn, D. Ortubay, S. *Nuestros Salmónidos*. Edición 1.991. Ministerio de Recursos Naturales. Provincia de Río Negro, Dirección de Pesca. Argentina. 120 pp.
49. Widmer, F. y Beffa, R. *Diccionario de Bioquímica y Biología Molecular*. España, Acribia, 2000. 247 pp.
50. Wolf, C. et.al. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species. *Food Science and Technology*. (3), 2, 144-150. 2000.
51. Wolf, C. et. al. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47, 1350-1355. 1999.
52. Yonker, W.V. Las Pesquerías de Salmón. *Tecnología de la Industria Pesquera*. España, Acribia, 1969. 443 pp.

