



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

ESTUDIO DE LA AUTENTIFICACIÓN E
IDENTIFICACIÓN ENTRE ESPECIES DE PULPO Y
CALAMAR EN PRODUCTOS CRUDOS Y PROCESADOS
AL AMPLIFICAR REGIONES ESPECÍFICAS DEL DNA
MITOCONDRIAL POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

MONICA ROXANA ROSAS MARTÍNEZ

ASESOR: DR. FRANCISCO MONTIEL SOSA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
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 :

Estudio de la autenticación e identificación entre especies de pulpo y calamar en productos crudos y procesados al amplificar regiones específicas del DNA mitocondrial por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

que presenta la pasante: Mónica Roxana Rosas Martínez
con número de cuenta: 09833608-5 para obtener el título de :
Ingeniera en Alimentos

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Enero de 2008

PRESIDENTE

Dr. José Francisco Montiel Sosa

VOCAL

MC. Rosa Manuela Arriaga Orihuela

SECRETARIO

QFB. Martha Patricia Zúñiga Cruz

PRIMER SUPLENTE

IA. Laura Margarita Cortazar

SEGUNDO SUPLENTE IA. Miriam Alvarez Velasco

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a la persona que más amo en este mundo, a ti Rafa por ser mi fuente de inspiración y motivación para superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor. Te amo!

A ustedes, que todavía no estas con nosotros pero contamos con ello.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis representa el esfuerzo y dedicación de todos los años de estudio, donde he crecido y me he desarrollado como persona, a explorar mis fortalezas y debilidades en mi accionar. Al igual he creado vínculos afectivos de amistad con compañeros, amigos y profesores que a lo largo de mi vida estarán en mi mente y corazón al formar parte de este proceso tan importante para mi vida.

Primero y antes que nada, debo dar gracias a Dios por estar conmigo, en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y poner en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte. Por darme vida y salud para este momento tan especial, sobre todo a tener mucha paciencia para seguir adelante a pesar de todo lo que parecía interminable.

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A mis padres, Silvi y Toño, por su cariño, comprensión y apoyo sin condiciones ni medida. Les agradezco hoy y siempre.

A mis hermanos Lili, Kary y Diego por la compañía y el apoyo que me brindan. Se que cuento con ustedes siempre.

Agradezco haber encontrado el amor y compartir mi existencia contigo Rafa. En su compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe.

A los amigos Mario, Gaby, Ranfery, Daniel, Luis y Sofi por su confianza y lealtad.

A la familia Elias Hernández, personas que desde el primer momento me brindaron todo su amor, apoyo, colaboración y cariño.

Un agradecimiento especial al Dr. Francisco Montiel Sosa, por la colaboración, paciencia y apoyo brindado desde siempre y sobre todo por esa gran amistad que me brindo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México representada por todos sus docentes y funcionarios que me otorgaron su apoyo en los años de estudio.

En general quisiera agradecer a todos y cada uno de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde lo más profundo de mi corazón les agradezco haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

A todos ellos, gracias.

J.A. Mónica R. Rosas Martínez

ÍNDICE

Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Presentación del trabajo	iii
Resumen	iv
Terminología	v
Introducción	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	4
1.1. Especies de Interés	4
1.1.1. El Calamar	4
1.1.1.1. Ubicación Sistemática de la familia de los Loliginidae	4
1.1.1.2. Generalidades del Calamar	4
1.1.1.3. Valor Nutritivo del Calamar	6
1.1.1.4. Principales tipos de Calamar	7
1.1.2. El Pulpo	11
1.1.2.1. Ubicación Sistemática de la familia de los Octopodidae	11
1.1.2.2. Generalidades del Pulpo	11
1.1.2.3. Valor Nutritivo del Pulpo	12
1.1.2.4. Principales tipos de Pulpo	13
1.1.3. Producción, importación y exportación del pulpo y calamar	17
1.2. Aplicaciones Biotecnológicas en la Autenticación de Alimentos	20
1.2.1. Métodos para Autenticación de Alimentos	20
1.2.1.1. Análisis de proteínas	20
1.2.1.2. Análisis de DNA	21
1.2.1.2.1. DNA mitocondrial	22
1.2.1.2.2. Hibridación de DNA	23
1.2.1.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
1.2.2. Descripción de la PCR	24
1.2.2.1. Fundamento de la PCR	24
1.2.2.2. Etapas de la reacción.	24
1.2.2.2.1. Desnaturalización	25
1.2.2.2.2. Hibridación	26
1.2.2.2.3. Elongación (extensión, replicación o polimerización)	26
1.2.2.3. Componentes de la Reacción	27
1.2.2.3.1. Oligonucleótidos	27
1.2.2.3.2. DNA polimerasa termoestable	30
1.2.2.3.3. Desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP's) en exceso	30
1.2.2.3.4. Cationes divalentes	30
1.2.2.3.5. DNA diana	30

1.2.2.4. Análisis del producto de la PCR	31
1.2.2.4.1. <i>Primers</i> específicos de las especies	31
1.2.2.4.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	32
1.2.2.4.3. Secuenciación de los productos de PCR	33
1.2.2.4.4. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	33
1.2.2.4.5. SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)	34
CAPÍTULO II. PROPUESTA METODOLÓGICA	35
2.1. Cuadro Metodológico	35
2.1.1. Descripción del Cuadro Metodológico	35
2.1.1.1. Objetivo Particular I	35
2.1.1.1.1. Actividad Preliminar	37
2.1.1.2. Objetivo Particular II	37
2.1.1.3. Objetivo Particular III	38
2.1.1.4. Objetivo Particular IV	38
2.2. Materiales	39
2.2.1. Material Biológico	39
2.2.2. Reactivos y Productos Biológicos	40
2.2.3. Equipo a utilizar	40
2.3. Métodos	41
2.3.1. Extracción de DNA total a partir del tejido muscular	41
2.3.2. Cuantificación de DNA por medio de la Absorbancia a 260 nm	42
2.3.3. Amplificación de DNA	43
2.3.3.1. Preparación para la reacción	43
2.3.3.2. Etapas y ciclos de la reacción	44
2.4. Análisis de producto	45
2.4.1. Preparación del gel de agarosa	45
2.4.2. Electroforesis horizontal (carga y corrida del gel)	46
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
3.1. Diseño y Selección de <i>primers</i>	47
3.1.1. Secuencia Completa del genoma mitocondrial del <i>Octopus Vulgaris</i>	47
3.1.2. Secuencia Completa del genoma mitocondrial del <i>Loligo Bleekeri</i>	48
3.1.3. <i>Primers</i> propuestos	49
3.1.3.1. Patrón A	49
3.1.3.1.1. Características del <i>primer</i>	49
3.1.3.1.2. Programa del Termociclador	49
3.1.3.1.3. Alineación de <i>primers</i>	50
3.1.3.2. Patrón B	51
3.1.3.2.1. Características del <i>primer</i>	51
3.1.3.2.2. Programa del Termociclador	52
3.1.3.2.3. Alineación de <i>primers</i>	52
Conclusiones	54
Referencias Bibliográficas	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>Loligo vulgaris</i>	7
Figura 1.2. <i>Loligo pealii</i>	8
Figura 1.3. <i>Loligo opalescens</i>	8
Figura 1.4. <i>Loligo plei</i>	9
Figura 1.5. <i>Loligo brevis</i>	9
Figura 1.6. <i>Loligo bleekeri</i>	10
Figura 1.7. <i>Octopus vulgaris</i>	13
Figura 1.8. <i>Octopus macropus</i>	13
Figura 1.9. <i>Octopus rubescens</i>	14
Figura 1.10. <i>Octopus burryi</i>	14
Figura 1.11. <i>Enteroctopus dofleini</i>	15
Figura 1.12. <i>Octopus maya</i>	15
Figura 1.13. Producción de Pulpo y Calamar en México	18
Figura 1.14. Exportación e Importación de Pulpo y Calamar	19
Figura 1.15. Representación del mecanismo de la PCR	25
Figura 1.16. DNA resultante en el transcurso de los ciclos	28
Figura 1.17. Gel de electroforesis para productos de PCR con <i>primers</i> específicos	32
Figura 2.1. Cuadro Metodológico	36
Figura 2.2. Esquematización para un programa de termociclador	44
Figura 3.1. Genoma mitocondrial de <i>Octopus Vulgaris</i>	47
Figura 3.2. Genoma mitocondrial de <i>Lloligo Bleekeri</i>	48
Figura 3.3. Programa de termociclador. Patrón A	49
Figura 3.4. Alineación de <i>primers</i> pulpo vs secuencia completa pulpo. Patrón A	50
Figura 3.5. Alineación de <i>primers</i> calamar vs secuencia completa calamar. Patrón A	50
Figura 3.6. Alineación de <i>primers</i> universal vs secuencia completa pulpo. Patrón A	50
Figura 3.7. Alineación de <i>primers</i> universal vs secuencia completa calamar. Patrón A	51
Figura 3.8. Programa de termociclador. Patrón B	52
Figura 3.9. Alineación de <i>primers</i> pulpo vs secuencia completa pulpo. Patrón B	52
Figura 3.10. Alineación de <i>primers</i> calamar vs secuencia completa calamar. Patrón B	53
Figura 3.11. Alineación de <i>primers</i> universal vs secuencia completa pulpo. Patrón B	53
Figura 3.12. Alineación de <i>primers</i> universal vs secuencia completa calamar. Patrón B	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Composición por 100 gr de alimento de calamar	6
Tabla 1.2. Composición de ácidos grasos por 100 gr. de alimento de calamar	6
Tabla 1.3. Compuestos inorgánicos por 100 gr. de alimento de calamar	7
Tabla 1.4. Compuestos vitamínicos por 100 gr. de alimento de calamar	7
Tabla 1.5. Composición por 100 gr. de alimento de pulpo	12
Tabla 1.6. Composición de ácidos grasos por 100 gr. de alimento de pulpo	12
Tabla 1.7. Compuestos inorgánicos por 100 gr. de alimento de pulpo	12
Tabla 1.8. Compuestos vitamínicos por 100 gr. de alimento de pulpo	12
Tabla 1.9. Diseño de <i>primers</i>	29
Tabla 2.1. Componentes de la PCR, preparación de los ensayos	43
Tabla 2.2. Componentes de un gel de agarosa para electroforesis	45
Tabla 2.3. Volumen de los compuestos utilizados en la electroforesis	46
Tabla 3.1. Características de los <i>primers</i> del patrón A	49
Tabla 3.2. Características de los <i>primers</i> del patrón B	51

PRESENTACIÓN DEL TRABAJO

La presente tesis es una propuesta metodológica que consta de dos partes fundamentales; la primera corresponde a la parte teórica que da sustento al desarrollo del proyecto y a los resultados esperados y, la segunda es la parte metodológica en la que se detalla paso a paso cómo desarrollar el trabajo y así llevarlo a nivel laboratorio para su experimentación.

Debido a que la sección teórica es fundamental para este trabajo, se ha dividido en dos partes y así dar mejor consistencia al texto. En el primer capítulo se describen los moluscos en estudio, desde el punto de vista biológico, nutricional, tecnológico y económico de cada uno con el fin de presentar en forma detallada la razón por la que se utilizó al pulpo en contraste con el calamar como objetos de identificación, además se 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.

Posteriormente el segundo capítulo incluye la metodología que se requiere para llevar a cabo paso a paso exitosamente el proyecto, el material y equipo, así como también las condiciones de trabajo, *primers* específicos y el análisis que se debe de realizar del producto.

RESUMEN

El presente trabajo muestra la propuesta metodológica de un método recientemente utilizado en la autenticación de alimentos, conocido como la Reacción en Cadena de la Polimerasa o Polymerase Chain Reactio (PCR).

El método se ha probado para la autenticación de especies enmascaradas bajo productos ya procesados que difícilmente se pueden identificar a simple vista por el consumidor; este método se ha probado sobre diversas especies. Así pues, este trabajo implicó el diseño de propuesta de *primers* específicos y el planteamiento del protocolo de dicha técnica para el estudio requerido con el que se pudiera diferenciar especies filogenéticamente cercanas, que por razones económicas y biológicas pudieran ser utilizadas bajo el nombre de otras especies procesadas que no son, como es el caso del pulpo y calamar.

TERMINOLOGÍA

A	Base nitrogenada, Adenina
Amplificado	Producto resultante de la PCR. Fragmentos específicos de DNA dúplex multiplicados durante la reacción.
Annealing	Apareamiento, base-pairing. Asociación de hembras simples complementarias de DNA para formar una doble hélice
BrEt	Bromuro de Etidio
C	Base nitrogenada, Citosina
Citb	Citocromo b
DNA Diana	DNA molde, plantilla, template, target. Fragmento al que se dirige la PCR, delimitado por los <i>primers</i> .
DNA polimerasa	Enzima que cataliza la síntesis de ADN a partir de desoxirribonucleótidos y de una molécula de ADN plantilla o molde que es la que será copiada. Son Desoxinucleotidos con dos átomos de fósforo mas, que suelen agregarse en concentraciones superiores a lo establecido ya que se gastan en la reacción rápidamente, la concentración de dNTP y el $MgCl_2$ va relacionada. Ya que la enzima necesita de Mg para poder incorporar a los dNTP
dNTP's	
Elongación	Extensión, replicación, polimerización. Etapa de la PCR en la que DNA polimerasa amplifica al DNA diana a partir de los <i>primers</i> .
G	Base nitrogenada, Guanina
MtDNA	DNA mitocondrial
Nm	Unidad de longitud de onda Nanómetro
Nt	Nucleótido (s)
Pb	Pares de bases

PCR	Abreviatura en inglés de Polymerase Chain Reaction. (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
<i>Primers</i>	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.
T	Base nitrogenada, Timina
Taq polimerasa	Enzima aislada del una bacteria (<i>Thermophilus acuaticus</i>), que es capaz de incorporar nucleótidos libres en el extremo 3' del <i>primer</i> unido a la cadena principal; formando así una cadena complementaria.
Tm	Melting temperature. Temperatura de Fusión
μL	Unidad de Volumen Microlitro
μM	Unidad de Cantidad Micromol

INTRODUCCIÓN

La espectacular expansión de la producción y el consumo que caracteriza actualmente a las sociedades económicamente desarrolladas ha generado una nueva necesidad: la defensa del consumidor contra los abusos y fraudes derivados del desequilibrio de fuerzas que hay entre consumidores y productores. Uno de estos fraudes podría consistir en realizar un producto elaborado y no mencionar en la etiqueta qué parte del mismo esta confeccionado por determinados productos bases.

Los primeros análisis llevados a cabo para conocer el origen de los diferentes tipos de carne no estaban basados en biología molecular. Así, los utilizados eran estudios de composición química (Crosland y Cols,1995), estudios de las distintas proteínas que componen el alimento mediante electroforesis en gel (Savage y Cols,1995), mediante microscopía (Pickering y Cols,1995a) e incluso por inmunología (Pickering y Cols,1995b). Sin embargo, cada uno de estos métodos presenta sus limitaciones. Los estudios de composición química presentan una gran variabilidad y los mismos autores no recomiendan este tipo de estudios para observar los distintos tipos de carne de las distintas especies animales que existen en los alimentos. En el caso de la utilización de electroforesis en acrilamida, a pesar de que los resultados obtenidos son mejores que los anteriores, tampoco se obtiene la diferenciación y se plantea el problema del estudio de las muestras una vez realizados los tratamientos que pueden desnaturalizar las proteínas.

Ante estos antecedentes, el estudio de secuencias de DNA específicas para conseguir detectar la existencia o no de diferentes especies animales en los alimentos resultaba una metodología muy interesante.

Sin embargo, a pesar de que la sensibilidad era superior a la mostrada por métodos tradicionales, resultaba larga y costosa si se comparaba con la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). No es pues de extrañar que fuera el método de elección con el fin de detectar fragmentos específicos ya que facilita la discriminación de especies dentro de un mismo género o incluso de razas dentro de una misma especie. Las diferencias moleculares no se corresponden, en la mayoría de los casos, con diferencias morfológicas, lo que hace necesario el desarrollo de pruebas de identificación genómicas para corroborar o corregir las clasificaciones taxonómicas existentes.

Dado el parecido morfológico entre el pulpo y el calamar, sería de utilidad el desarrollo de pruebas de identificación moleculares para diferenciar ambas especies y facilitar el control de los mercados.

El pulpo en México se comercializa mayoritariamente en fresco, aunque también se comercializa enlatado y congelado, sin embargo el pulpo procesado no se comercializa ampliamente en nuestro país, principalmente a la poca cultura tecnológica en México que se tiene para consumir estos productos. Tal circunstancia se refleja en altos costos de venta debido a su valor nutritivo, altos costos de proceso y, sobre todo, a la importancia en la

rama gastronómica pues se sabe de la exquisitez que puede ofrecerse en los productos asociados al pulpo.

El molusco con mayor semejanza al pulpo es el calamar, ambos cultivados en nuestro país, sólo que éste último cuenta con dos brazos además de los ocho tentáculos cubiertos de garfios y una concha interna por lo que hace que su carne sea mas dura y rígida. Es por esto que es posible encontrar a los diferentes tipos de calamar enmascarando productos a base de pulpo.

Así pues, este tipo de moluscos pueden ser ofrecidos en lugar del pulpo a altos costos de su valor real lo que constituye un fraude, especialmente si el molusco carece de sus características morfológicas originales y si las características que presenta pueden formar parte de los cambios que le confiere el procesamiento; ambos casos dificultan al consumidor detectar la originalidad del producto y su autenticidad.

La falsificación del pulpo y sus derivados es 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 pulpo en comparación al calamar puede llevar a las empresas empacadoras y/o productoras a ofrecer otras especies de moluscos con características organolépticas similares al pulpo 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.

La necesidad de identificar las especies que se involucran en los productos de pulpo se originó tras la aparición de fraudes, como se comentó anteriormente. 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 isoeléctrico 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 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:

- La ubicuidad del DNA (pues todas las células de los individuos presentan la información genética idéntica)
- La información que contiene el DNA, que es mas alta comparada con las proteínas

- 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 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 aun esta presente en los tejidos de pulpo y calamar 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 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 esta conformado por solo 13 genes, mientras que el DNA nuclear conjunta de 30 000 a 40 000 genes, lo que lo hace mas 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 pulpo y calamar, 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 moluscos procesados.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. ESPECIES DE INTERÉS. MOLUSCOS

Los moluscos comestibles pueden dividirse en tres grupos principales: los univalos, que solo tienen una concha; los vívalos, con dos conchas; y los cefalópodos. En el primer grupo se incluyen los caracoles terrestres y marinos, lapas y abalones; en el segundo, las ostras, almejas y mejillones; y, en el tercero; calamares, sepias y pulpos. Los moluscos constituyen alrededor del 7% de las capturas mundiales totales y desempeñan un papel importante en el mercado internacional. [27]

Así mismo, los cefalópodos se dividen en dos órdenes, de acuerdo con el número de brazos que presentan los organismos: los *Decabranchia* o decápodos y los *Octobranchia* u octópodos.

A los primeros pertenecen los calamares, las jibias y los chopos; son moluscos de cuerpo alargado, provistos de aletas laterales de forma triangular que llevan alrededor de la boca una corona de ocho brazos de longitud semejante entre sí y otros dos más largos; la concha es interna, muy reducida y de naturaleza córnea, ésta recibe el nombre de pluma. [21]

1.1.1. EL CALAMAR

1.1.1.1. Ubicación sistemática de la familia de los Loliginidae

La clasificación taxonómica del calamar es [20]:

- Clase Cephalopoda
- Subclase Coleoidea
- Superorden Decapodiformes
- Orden Teuthida
- Suborden Myopsina
- Familia Loliginidae
- Genus Loligo

1.1.1.2. Generalidades del Calamar

Los calamares deben su nombre a que su concha interna está constituida por una sustancia llamada conchilina en forma de una pluma junto con una bolsa de tinta. Su cuerpo es cilíndrico, comprimido y está formado por dos regiones: la “cabeza” que es la más cercana a los brazos, lleva los ojos y la boca; y el “manto” que se extiende por encima de ella, dentro del cual se encuentran los aparatos y sistemas. La carne del calamar es muy blanca y

se vuelve opaca durante el cocinado. Su textura es firme, ligeramente gelatinosa y deformable. [11, 21]

Las “patas” son de dos tipos: ocho llamadas “brazos” y dos que tienen una longitud mayor, los “tentáculos”, móviles y flexibles, con los que captura a sus presas y las lleva a su boca. Sus brazos, a lo largo, están cubiertos por ventosas y, en el caso de los tentáculos, únicamente en los extremos en forma de paleta. [21]

En la parte terminal del cuerpo que es larga y afilada, los calamares tienen un par de aletas laterales triangulares que utilizan como estabilizadores cuando nadan y con ellas pueden impulsarse cuando lo hacen lentamente.

Las diferentes especies de calamar viven como organismos pelágicos en los océanos Pacífico, Atlántico e Índico, varias de ellas forman la población pescable y son muy apreciadas como alimento y como uno de los más sabrosos manjares que gustan los aficionados al buen comer. [21]

Entre las principales especies de calamar se mencionan, en el Golfo de México, el “calamar de Peal” (*Loligo pealii*); en el Golfo de California, el “calamar opalino” (*Loligo opalescens*); en las costas de Chile, *Loligo gahi*; en Brasil el *Loligo brasiliensis*, llamado “lula” que llega hasta Argentina, en donde lo conocen como “calamareti”, también ahí se encuentra el calamarcillo *Loliguncula brevis* que se extiende hasta las Antillas. En Japón son comunes *Loligo japonica*, *Loligo beka* y *Loligo bleekeri*.

En las costas de Portugal y España representa uno de los recursos más importantes, por los grandes beneficios que produce, su captura se realiza en los meses de verano y la especie que más se obtiene es la *Loligo vulgaris*, también llamada “magano” y “chipirones”. [21]

El calamar es un producto de alto valor nutritivo, del que puede aprovecharse un 75% de partes comestibles, después de quitarle las vísceras. Contiene proteínas como la albúmina, vitaminas del complejo B y minerales como el fósforo.

La captura se maneja en fresco, conservándola en hielo, congelada y enlatándola con finos aceites. Generalmente en diversos países resulta uno de los alimentos más baratos, pero en México, por falta de estudios biológicos, así como de estudios sobre tecnología de captura, industrialización y comercialización, no ha llegado a desarrollarse plenamente esta pesquería, lo que la hace de alto valor monetario.

Existen 18 especies de calamares en las costas de México, correspondiendo 8 al Golfo de México y Mar Caribe, 6 a las costas del Pacífico Mexicano y 4 a ambos mares; al parecer son más abundantes en el Pacífico, principalmente en las regiones oceánicas, estimándose existencias aproximadas de 650 mil toneladas accesibles a la pesca por parte de una flota calamarera; sin embargo, en las últimas temporadas, por diferentes motivos, su captura a disminuido. [21]

Las áreas de pesca en el país son: la Sonda de Campeche en el Golfo de México, en donde se han capturado de 5 a 7 toneladas por hora de arrastre, para las costas del Pacífico, la

pesquería del calamar se ha ubicado principalmente en lo que se considera su caladero tradicional, en las aguas cercanas al Puerto de Santa Rosalía, en el Golfo de California.

La presentación del producto en el mercado es fresco-congelado y enlatado, ya sea en salmuera o en su tinta. El mercadeo es principalmente nacional y se enfrenta a grandes obstáculos, ya que en nuestro país el calamar no tiene una buena aceptación, principalmente por falta de publicidad. En cuanto al mercado internacional, es necesaria más definición en la calidad y en el tipo de los productos derivados, además de que se carece de la infraestructura tanto para la captura como para la industrialización. [21]

Aunque existe una gran diversidad de especies dentro de esta familia, para el fin del presente trabajo se menciona únicamente las más importantes que se comercializan.

1.1.1.3. Valor nutritivo del Calamar

El contenido proteico de este alimento es grande y de alta calidad, con suficiente cantidad de aminoácidos esenciales, el contenido en grasa e hidratos de carbono es escaso; mientras que su contenido en minerales es amplio y variado. A continuación se desglosa la composición de dicha especie. [5, 9]

✚ Tabla 1.1 Composición por 100 g de alimento [2, 19]

<i>Porción Comestible</i>	<i>Total (g)</i>				<i>Carbohidratos (g)</i>	<i>Valor Energético</i>	
	<i>Agua</i>	<i>Nitrógeno</i>	<i>Proteína</i>	<i>Grasa</i>		<i>kcal</i>	<i>kJ</i>
70	80.5	2.46	15.4	1.7	1.2	81	344

<i>Almidón (g)</i>	<i>Azúcares Totales</i>	<i>Fibra Dietética</i>	<i>Ácidos Grasos</i>			<i>Colesterol (mg)</i>
			<i>Saturados</i>	<i>Monosaturados</i>	<i>Polisaturados</i>	
Tr	Tr	0	0.34	0.1	0.48	225

✚ Tabla 1.2 Composición de ácidos grasos por 100 g de alimento [19]

<i>AGS (g)</i>			<i>AGM (g)</i>		<i>AGP (g)</i>						<i>AGP/AGS</i>	<i>AGP+AGM AGS</i>
<i>C14:0</i>	<i>C16:0</i>	<i>C18:0</i>	<i>C16:1</i>	<i>C18:1</i>	<i>C18:2</i>	<i>C18:3</i>	<i>C20:4</i>	<i>C20:5</i>	<i>C22:5</i>	<i>C22:6</i>		
0.034	0.248	0.055	0.007	0.043	0.002	0.004	0.008	0.137	0.004	0.322	1.43	1.72

⊕ Tabla 1.3 Compuestos Inorgánicos por 100 g de alimento [2]

mg										μg	
Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn	Cl	Mn	Se	I
110	280	13	28	190	0.5	0.98	1.1	N	0.02	66	20

⊕ Tabla 1.4 Compuestos Vitamínicos por 100 g de alimento [2]

Retinol μg	Caroteno μg	Vitamina D μg	Vitamina E mg	Tiamina Mg	Riboflavina mg	Niacina mg
15	0	Tr	1.20	0.10	0.12	3.4

Triptofano 60 mg	Vitamina B ₆ Mg	Vitamina B ₁₂ μg	Folate μg	Pantotenato Mg	Biotina μg	Vitamina C mg
3.3	0.69	3	13	0.68	N	0

1.1.1.4. Principales tipos de Calamar

⊕ Calamar (*Loligo vulgaris*)

La longitud que llegan a alcanzar es; en machos 64 cm y en hembras 36 cm. Pesa aproximadamente 447 gramos y su longevidad es de 3,430 días. Esta especie también se puede encontrar en países como Italia, Egipto, Francia, Portugal, Nigeria, entre otros. [20]



Figura 1.1 *Loligo vulgaris*

⊕ Calamar de Peal o Calamar Pálido (*Loligo pealii*)

La longitud que llegan a alcanzar es; en machos 50 cm y en hembras 40 cm. Su nombre se debe a que su cuerpo tiene una coloración blanquecina. Esta especie también se puede encontrar en países como Canadá, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, entre otros. [20]



Figura 1.2 *Loligo pealii*

⊕ Calamar Opalino (*Loligo opalescens*)

La longitud que llegan a alcanzar es; en machos 19 cm y en hembras 17 cm. Pesa aproximadamente 21 gramos y su longevidad es de 184 días. Esta especie también se puede encontrar en países como Canadá, Chile y E. U. A. [20]



Figura 1.3 *Loligo opalescens*

✦ Calamar Flecha (*Loligo brasiliensis* o *Loligo plei*)

La longitud que llegan a alcanzar es; en machos 35 cm y en hembras 22 cm. Esta especie también se puede encontrar en países como México, Honduras, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, entre otros. [20]

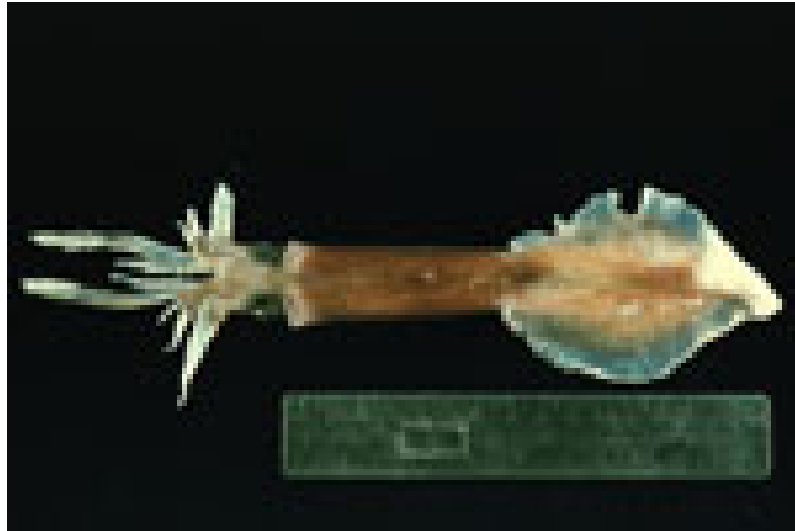


Figura 1.4 *Loligo plei*

✦ Calamar Dedal (*Loligo brevis* o *Lolliguncula brevis*)

La longitud que llegan a alcanzar es; en machos 8 cm y en hembras 12 cm. Esta especie también se puede encontrar en países como México, Belice, Brasil, Panamá, EUA, Cuba, entre otros. [20]

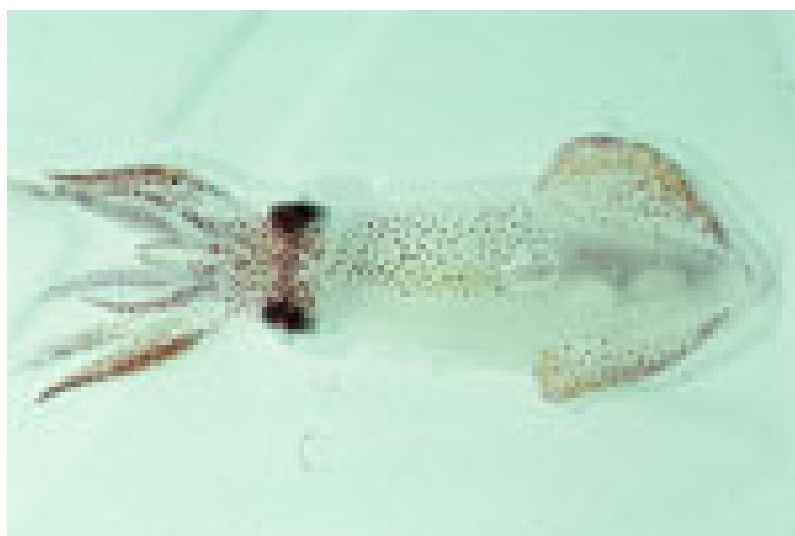


Figura 1.5 *Loligo brevis*

✦ Calamar Lanceolado (*Loligo bleekeri*)

Esta especie llega a medir hasta 40 cm. Se encuentra también en las costas de Corea.



Figura 1.6 *Loligo bleekeri*

✦ Calamar Patagónico (*Loligo gahi*)

Esta especie llega a medir hasta 28 cm. Se encuentra también en las costas de Argentina, Chile, Perú y Uruguay.

✦ Calamar Beka (*Loligo beka*)

Esta especie llega a medir hasta 7 cm. Se encuentra también en las costas de China, Corea, Filipinas y Taiwán.

✦ Calamar Japonés (*Loligo japonica*)

Esta especie llega a medir hasta 12 cm. Se encuentra también en las costas de China, Corea, Filipinas y Taiwán.

1.1.2. EL PULPO

1.1.2.1. Ubicación sistemática de la familia de los Octopodidae

La clasificación taxonómica de los pulpos es [20]:

- Clase Cephalopoda
- Subclase Coleoidea
- Superorden Octopodiformes
- Orden Octopoda
- Suborden Incirrina
- Familia Octopodidae
- Subfamilia Octopodinae
- Genus Octopus

1.1.2.2. Generalidades del Pulpo

Los pulpos pertenecen a la orden de los octópodos: cefalópodos de cuerpo globoso y desprovisto de aletas natatorias, son ocho los brazos que rodean a su boca, sin presentar los dos tentáculos, ni la concha interna del calamar. Son de cuerpo blando y viscosos con tentáculos provistos de ventosas que se adhieren fuertemente cuando capturan a sus presas o cuando se desplazan utilizando para ello sus brazos que se fijan en el sustrato.

Los pulpos también son capaces de cambiar de coloración y aspecto, para poderse confundir con el ambiente donde viven, cambian de tonalidades en segundos y los colores recorren su cuerpo en oleadas, tomando el color del fondo. Junto con estos cambios de color pueden lanzar un líquido de color negro llamado “tinta”, que se difunde con rapidez en el agua volviéndose turbia, lo que es empleado como mecanismo de defensa.

La localización de estos animales es desde la zona intermareal, viviendo entre las rocas, los arrecifes de coral o los pastos marinos, hasta profundidades de 1,500 metros.

La distribución del pulpo es extensa: se encuentra en el Atlántico norte, Mar del Norte, Atlántico sur, Pacífico, Indo pacífico y Mediterráneo. Su pesquería está muy desarrollada en países como Japón, Uruguay, Argentina y España que en conjunto capturan aproximadamente el 85% del total mundial.

En México la pesquería de pulpo se encuentra establecida fundamentalmente en las costas del Golfo de México y Mar Caribe; son siete especies del género *Octopus* las que se capturan; el grueso de la pesquería está formado por el “pulpo común” (*Octopus vulgaris*) o por el *Octopus maya* de las costas de la península de Yucatán. En el Océano Pacífico se captura una sola especie en Baja California, el “pulpo manchado” (*Octopus macropus* o *Paraoctopus limaculatus*) o pulpo de pacífico, el resto son el *Octopus januarii*, *Octopus burryi*, *Octopus rubescens*, *Enteroctopus panamensis* y *Enteroctopus dofleini*. [20, 21]

1.1.2.3. Valor nutritivo del Pulpo

⊕ Tabla 1.5. Composición por 100 g de alimento [2, 19]

Porción Comestible	Total (g)				Carbohidratos (g)	Valor Energético	
	Agua	Nitrógeno	Proteína	Grasa		kcal	kJ
79	82.1	2.86	17.9	1.3	1.5	83	352

Almidón (g)	Azúcares Totales	Fibra Dietética	Ácidos Grasos			Colesterol (mg)
			Saturados	Monosaturados	Polisaturados	
Tr	Tr	0	0.3	0.2	0.5	48

⊕ Tabla 1.6. Composición de ácidos grasos por 100 g de alimento [19]

Ácidos Grasos Saturados (g)	Ácidos Grasos Monosaturados (g)	Ácidos Grasos Polisaturados (g)
0.14	0.07	0.14

⊕ Tabla 1.7. Compuestos Inorgánicos por 100 g de alimento [2]

mg										μg	
Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn	Cl	Mn	Se	I
N	230	33	N	170	1.2	0.40	1.7	N	0.02	75	20

⊕ Tabla 1.8. Compuestos Vitamínicos por 100 g de alimento [2]

Retinol μg	Caroteno μg	Vitamina D μg	Vitamina E mg	Tiamina Mg	Riboflavina mg	Niacina mg
5	0	Tr	N	0.07	0.07	5.0

Triptofano 60 mg	Vitamina B ₆ mg	Vitamina B ₁₂ μg	Folate μg	Pantotenato Mg	Biotina μg	Vitamina C mg
3.8	0.36	N	N	N	N	0

Las conservas de pulpo son un alimento de alto valor nutritivo. Su vianda tiene un contenido proteico similar a la carne de ternera y un alto valor biológico por su digestibilidad. En comparación con otros mariscos, el pulpo es poco calórico y su contenido en grasas y colesterol es, por tanto, muy bajo. [1]

1.1.2.4 Principales tipos de Pulpo

✦ Pulpo Común (*Octopus vulgaris*)

Esta especie llega a medir hasta 25 cm de cuerpo y un metro de longitud en los tentáculos. Pesa aproximadamente 2,417 gramos en su madurez y su longevidad es de 435 días. Se encuentra también en las costas de México, Egipto, Alemania, Grecia, Honduras, Venezuela, etc.



Figura 1.7. *Octopus vulgaris*

✦ Pulpo Manchado o patón (*Octopus macropus*)

Esta especie llega a medir hasta 15 cm de cuerpo y más de un metro de longitud en los tentáculos. Esta especie también se puede encontrar en países como México, Colombia, Brasil, Francia, El Salvador, Jamaica, entre otros. [20]



Figura 1.8. *Octopus macropus*

✦ Pulpo Manchado o patón (*Octopus rubescens*)

Esta especie llega a medir hasta 10 cm de cuerpo y alrededor de 30 cm de longitud en los tentáculos. Esta especie se encuentra también en las costas de México y Japón. [20]



Figura 1.9. *Octopus rubescens*

✦ Pulpo Granuloso (*Octopus burryi*)

Esta especie llega a medir alrededor de 8 cm de cuerpo y 15 cm de longitud en los tentáculos. Esta especie se encuentra también en las costas de México, EUA, Puerto Rico, Brasil, Cuba, Bahamas, entre otras. [20]

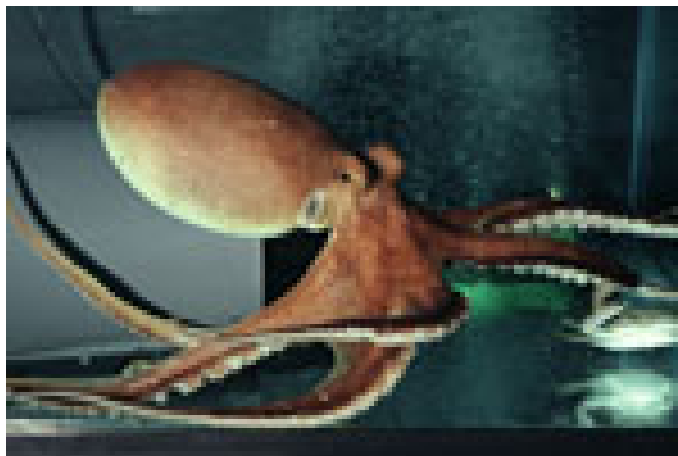


Figura 1.10. *Octopus burryi*

✦ Pulpo Gigante (*Enteroctopus dofleini*)

Esta especie llega a medir hasta 3 metros de longitud y las hembras crecen más que los machos. Esta especie se encuentra también en las costas de México, Alaska, Canadá, China, Filipinas, Taiwán, entre otras. [20]



Figura 1.11. *Enteroctopus dofleini*

✦ Pulpo Mexicano (*Octopus maya*)

Esta especie llega a medir alrededor de 25 cm de manto y menos de un metro de longitud en los tentáculos. Pesa aproximadamente 3,262 gramos en su madurez y su longevidad es de 257 días. Esta especie se encuentra también en las costas de Cuba, Guatemala y Belice. [20]



Figura 1.12. *Octopus maya*

✦ *Enteroctopus panamensis*

Esta especie llega a medir hasta 3.2 cm de longitud. Esta especie solo se encuentra en las costas de México. [20]

✦ Pulpo Filamentoso (*Octopus januarii*)

Esta especie llega a medir alrededor de 7 cm de manto. Esta especie se encuentra también en las costas de México, Guatemala, Honduras, Colombia, Cuba, Brasil, entre otras.

1.1.3. Producción, importación y exportación de pulpo y calamar

En el ámbito nacional el pulpo ocupa el doceavo lugar en cuanto a captura, en tanto que en el litoral del Golfo de México y Caribe es la cuarta pesquería más importante. El 98% de la producción nacional proviene de Yucatán, Campeche y Quintana Roo (SEMARNAP, 1999). El aumento en el volumen de producción y la demanda internacional han llevado a esta pesquería a ocupar el tercer lugar nacional por su valor comercial, superada sólo por el camarón y el atún.

Cabe destacar que en 1996 la gran demanda del molusco por parte del mercado internacional, particularmente de Japón, Corea, España e Italia, promovió la explotación lo que se reflejó en un registro récord superior a las 28,000 t. Como consecuencia de esto, los industriales pesqueros de la entidad contaron con recursos económicos suficientes para cumplir con la regulación de higiene en el procesamiento de productos pesqueros, compromiso nacional dentro del marco del Tratado de Libre Comercio, para la modernización de plantas congeladoras. Así mismo, se incrementó la inversión en contrabandos, embarcaciones menores y equipo para conservar el producto a bordo.

La pesquería recae principalmente en dos especies: *Octopus maya*, llamado pulpo rojo, y *O. vulgaris*, pulpo patón. La primera se captura de agosto a noviembre a lo largo de las costas de Campeche y Yucatán a profundidades entre las 0 y 15 brazas, a bordo de embarcaciones menores de 5.5 a 9.0 m de longitud. La segunda predomina en un 60% de noviembre a diciembre en la captura de la flota mayor del estado de Yucatán (de 12 a 22 m de eslora), la cual se realiza entre las 10 y 30 brazas de profundidad. [28]

En el caso del calamar el mercado es principalmente nacional y se enfrenta a grandes obstáculos, ya que el calamar en nuestro país no tiene una buena aceptación, principalmente por falta de publicidad. En cuanto al mercado internacional, es necesario más definición en la calidad y en el tipo de los productos derivados, además de que se carece de la infraestructura tanto para la captura como para su industrialización. [21]

Las cifras de captura de pulpo y calamar han formado una base importante en el estudio presentado, debido a que el volumen de producción total entre ambas especies en sus distintas presentaciones en nuestro país es muy desigual siendo que contamos con ambas especies en el mercado fresco–congeladas y enlatadas, ya sea en salmuera o en su tinta.

De acuerdo con los datos de la FAO, en México se produce muy poco calamar como se muestra en la figura 1.13, sin embargo, la producción de pulpo en nuestro país muestra cifras significativas y esto puede verse con mas detalle con los datos de importación y exportación para México en 2004 presentados en la figura 1.14.

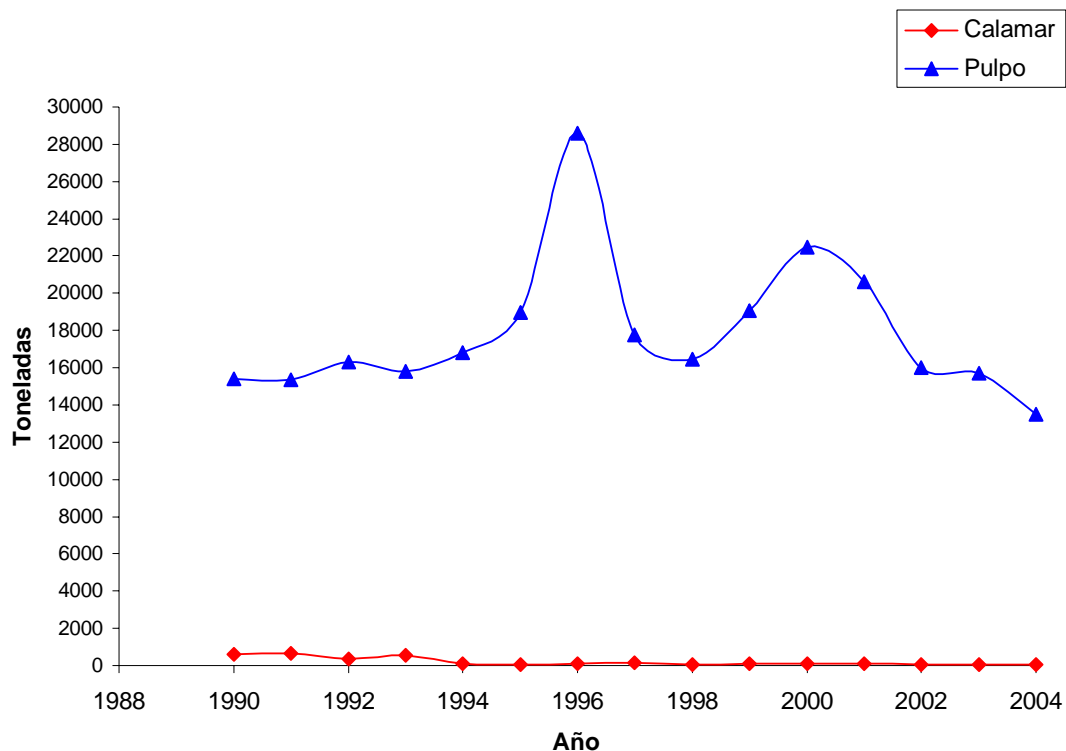


Figura 1.13. Producción de pulpo y calamar en México

Aunque en los últimos años en nuestro país no existe la producción de calamar, una cantidad importante de estos moluscos que se consumen y procesan en México pertenecen a los volúmenes de importación, sin embargo no son considerables a comparación de la cantidad que se encuentra en el mercado ya procesado.

Por otro lado, la producción de pulpo en México rebasa en casi 200% la cifra de exportación de esta misma especie (8,700 toneladas para el año 2004), sin embargo se importa solo una pequeña cantidad (aproximadamente el 7% de la producción total, es decir, 878 toneladas de pulpo en el año 2004), 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 una especie con otra ya que encontramos en el mercado productos frescos y procesados de pulpo y calamar en grandes cantidades por igual a demás de que registran producto 100% nacional en ambos casos. Es probable que productos derivados del calamar contengan carne de pulpo ya que los datos de importación no respaldan las cifras de productos de esta especie y mucho menos los de producción nacional. [8]

No con esto se pretende rechazar al calamar como alimento, por lo que es aun más importante alentar a los productores de pulpo para que también se interesen en la captura de calamar y así ofrezcan productos derivados de este y disminuir las posibles alteraciones que podrían existir.

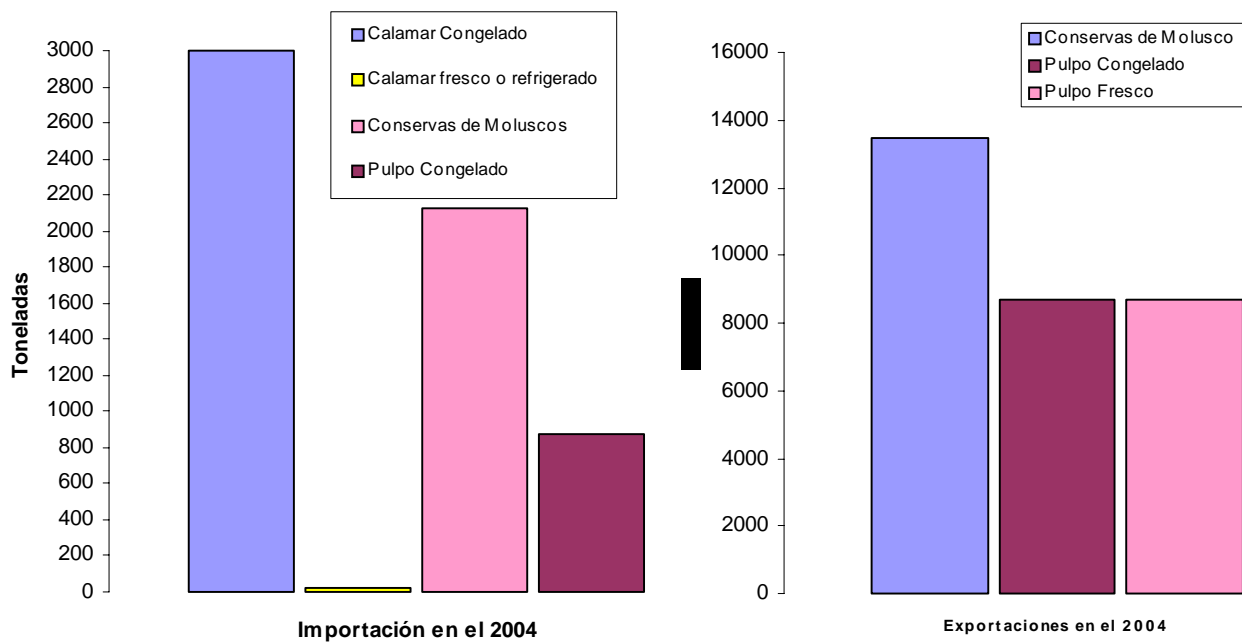


Figura 1.14. Importación y Exportación de pulpo y calamar

1.2. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS EN LA AUTENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS

1.2.1. MÉTODOS PARA AUTENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS

La investigación científica en el tema de autentificación 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.

1.2.1.1. Análisis de proteínas

El análisis de proteínas 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 la prueba, se puede comprobar la autenticidad de las especies cuando se compara con un perfil propio de la especie, es decir, la prueba se realiza utilizando a la especie auténtica. [14]

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. [16]

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 enlatado 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. [12]

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, en 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. [14]

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 éste 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 y los moluscos.¹ [15]

1.2.1.2. 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 mas adecuado para la búsqueda de autenticidad en los productos de alimentos procesados. [16]

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 mas 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. Aun 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 identificar ha sido el principal parámetro para la selección del método adecuado de autenticación. [4, 12, 14]

El análisis de DNA esta 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.

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

1.2.1.2.1. DNA Mitocondrial

Algunas de las características que tiene el mtDNA para su uso en estudios genéticos son las siguientes:

- Se hereda por todas las personas procedentes de su madre. La secuencia de una determinada molécula de mtDNA es llamada *haplotipo*, ya que el genoma mitocondrial es haploide, esto es debido a que en humanos, la herencia es estrictamente uniparental materna. Esto quiere decir, que salvo *mutación*, el mtDNA de hermanos, de hijos y madre y en general de aquellos individuos relacionados por vía materna es idéntico.
- El mtDNA tiene menor densidad que el nuclear.
- El mtDNA es capaz de replicarse por fisión simple ya que cuenta con una máquina completa para la expresión de la información incluida en la molécula de DNA.
- El DNA nuclear está estrechamente asociado con proteínas y repartido en cromosomas, en cambio, el mtDNA se asemeja al DNA bacteriano en su forma de doble hélice circular. [22]
- Debido a que el mtDNA se encuentra en miles de copias dentro de una célula, es posible amplificar un fragmento aun cuando el tejido halla sido desnaturalizado.
- Se conocen gran variedad de secuencias completas de mtDNA en especies animales.
- La gran variabilidad del mtDNA permite la identificación confiable de especies precisas dentro de una mezcla.
- La variabilidad intraespecífica del mtDNA permite la posibilidad de identificar diferentes especies dentro de una misma familia. [17]
- Aunque el mtDNA contiene mucha menos información que el DNA nuclear, en cambio, tiene muchas mas copias por célula.
- El mtDNA tiene una tasa de mutación de 5-10 veces mayor que el DNA nuclear, esto puede ser explicado por una serie de factores entre los que cabe destacar el hecho que el mtDNA es muy sensible al daño oxidativo producido por los radicales libres liberados en la zona, además de que carece del efecto protector de las histonas (proteínas que si están presentes en el DNA nuclear) y por último, la baja fidelidad de la polimerasa del mtDNA y la aparente carencia de mecanismos de reparación colaboran con la alta tasa mutacional implicando una alta hipervariabilidad entre la población humana y ausencia de recombinación
- Solo se necesita una pequeña porción de tejido para poder sustraer la información genética a base del mtDNA, a diferencia del nuclear
- Se puede obtener información genética del mtDNA aunque el tejido presente una excesiva degradación
- El análisis de mtDNA puede también ser usado para análisis de identificación de especies estudiando zonas como el extremo 5' del gen del Citocromo b. [18, 22]

1.2.1.2.2. Hibridación de DNA

El método de hibridación de DNA esta 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. [13]

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.

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. [13]

1.2.1.2.3. 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 puede 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 mas profundamente por otros métodos, o bien, para ser secuenciado.

² 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. [12]

La reacción en cadena de la polimerasa tiene un alto potencial para 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 que definen su alta fidelidad para dicho fin.

1.2.2. 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.

1.2.2.1. Fundamento de la PCR

El fundamento se basa en la síntesis de millones de copias de un fragmento específico de DNA determinado 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 reacción 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.

1.2.2.2. Etapas de la reacción

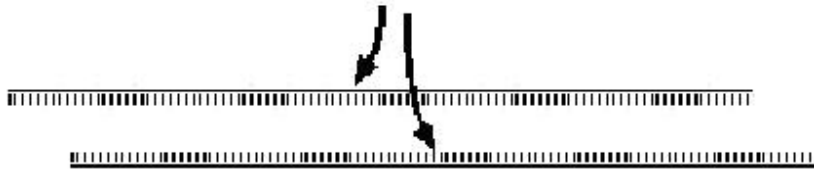
Esta reacción no es precisamente una técnica, sino una metodología en la que se aplican tres conceptos fundamentales: 1) Desnaturalización de la cadena doble de DNA, 2) Hibridación de la hebra sencilla con un oligonucleico y 3) Replicación de las hebras sencillas de DNA por la acción de una DNA polimerasa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

Todas las etapas de la reacción se definen especialmente por llevarse a cabo a temperaturas distintas. La figura 1.15. 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.

A) La doble cadena de DNA presente en la reacción



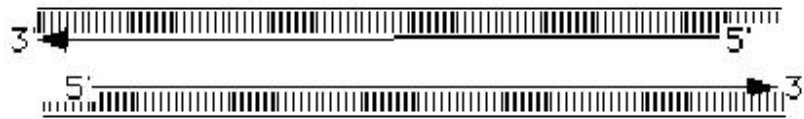
B) Etapa de desnaturalización de DNA



C) Hibridación de los *primers* con las cadenas simples de DNA



D) Elongación de la cadena por la enzima DNA polimerasa



E) Nuevas cadenas de DNA resultantes de un ciclo de PCR

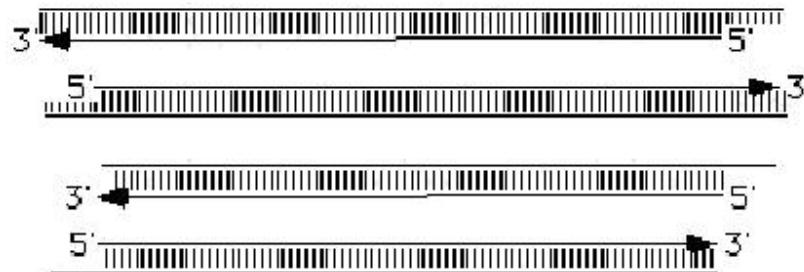


Figura 1.15. Representación del mecanismo de la PCR

1.2.2.2.1. Desnaturalización

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

La desnaturalización se debe tanto a la ruptura de puentes de hidrógeno entre pares de bases, como de las interacciones hidrofóbicas entre bases ampliadas 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 rupturas de enlaces covalentes. La figura 1.15-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.

La desnaturalización puede llevarse a cabo por efectos 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. [13]

1.2.2.2. 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 1.15-C (ver página 25) 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'. [13]

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

1.2.2.3. Elongación (extensión, replicación o polimerización)

Esta es la etapa de amplificación 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 (dNTP's).

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 1.15-D (página 25). La enzima DNA polimerasa no ha sido simbolizada, sin embargo se ha encargado de unir ya

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 mas abundantes que A=T, la temperatura de fusión aumentará debido a que la interacción en C≡G es mas fuerte que A=T. Esto implica que para que suceda la desnaturalización la T_m deba ser 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: $T_m = 4 (\#G + \#C) + 2 (\#A + \#T)$

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 1.15-E página 25), sin embargo, este se ira 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 complementen 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 resultantes de cada ciclo se representa en la figura 1.16. (ver página 28).

1.2.2.3. 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 de oligonucleótidos o *primers*, 2) dNTP's 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 al protocolo de amplificación, deben tener características específicas.

1.2.2.3.1. 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. Estos 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 determinan 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 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 es éstos ante la especie en cuestión e incluso su correcto desempeño durante la reacción. [24, 25]

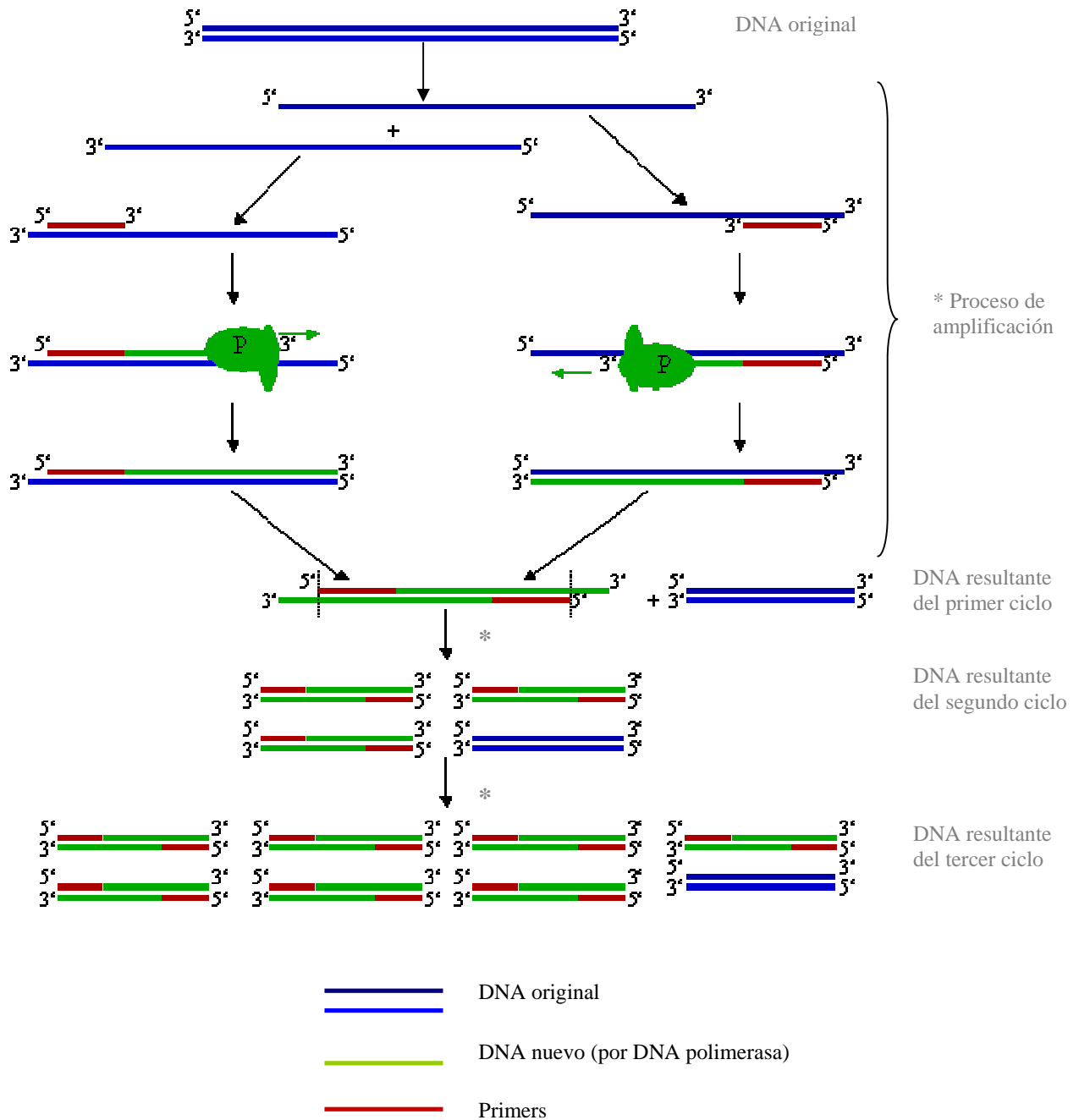


Figura 1.16. DNA resultante en el transcurso de los ciclos

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

Tabla 1.9. Diseño de *primers*: Propiedades de los oligonucleótidos que influyen en la eficiencia de amplificación.⁴

PROPIEDAD	DISEÑO ÓPTIMO
Composición de las bases	El contenido de G+C deberán estar entre 40 y 60% en la secuencia. Las cuatro bases deberán 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 pb 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, primers y nucleótidos, por lo que pueden suprimir a 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 de 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 CCNG o NNGC a su final 3' no son recomendados debido al inusual alto ΔG de las bases GC terminales, lo que principia 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. [24]

1.2.2.3.2. DNA polimerasa termoestable

La enzima DNA polimerasa se encarga de unir nucleótidos dNTP's 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 la 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 mas empleada es la Taq polimerasa, cuyo nombre se debe a que es procedente de una bacteria llamada *Thermus aquaticus*.⁵

1.2.2.3.3. Desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP's) 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 dATP's, dTTP's, dGTP's y dCTP's.

1.2.2.3.4. 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 dNTP's 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 fosfatos que aportan los dNTP's más los *primers*. [24]

1.2.2.3.5. DNA diana

La adición de DNA a la reacción implica su previa extracción de la célula o el 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

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 5000 nucleotidos 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 mas 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* [13, 24]

concentración adecuada para lograr una amplificación adecuada.⁶ 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.

1.2.2.4. Análisis del producto de la PCR

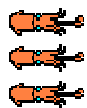
Los métodos disponibles para el análisis de los productos amplificados por PCR, dependen directamente del diseño de la reacción y de los *primers* utilizados. En algunos casos será requerida más de una técnica secundaria para establecer la especie equivalente.

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 localizan en múltiples genes simultáneamente para producir un patrón parecido a una huella digital, se utilizan los análisis RAPD's 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 dentro de un mismo producto. Las técnicas presentadas se mencionan a continuación. [10]

1.2.2.4.1. *Primers* específicos de las especies

Cuando se refiere a la utilización de *primers* específicos de las especies, se espera que los *primers* generen solo 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 1.17 muestra el perfil que

⁶ Experimentalmente se ha conocido que la concentración adecuada es cercana a 3.5 pg/ μ l.

presentaría una muestra amplificada correctamente por este método, en cuyo caso, el carril **A** muestra el marcador molecular, el carril **2** y **4** muestran productos de PCR con *primers* específicos de cierta especie que hubieran sido diseñados esperando la amplificación de un fragmento de ~929 pb. El caso **3** no muestra amplificado puesto que el *primer* no habría apareado con la especie, siendo esta una especie extraña (diferente a la buscada), por lo contrario, el caso **1** presenta una banda correspondiente al tamaño esperado, lo que implica que representaría la presencia de la especie buscada [12, 25]

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.

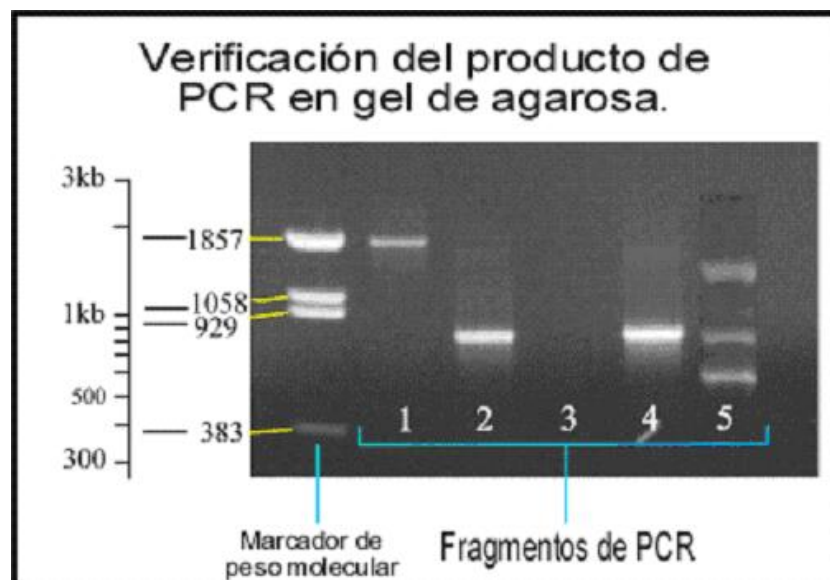


Figura 1.17. Análisis electroforético para productos de PCR que utilizaron *primers* específicos

1.2.2.4.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Para un análisis RAPD se requieren *primers* cortos de ~10 bases que forman híbridos al azar con muchas plantillas de 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. Dada las condiciones apropiadas para la reacción PCR, la amplificación resultante es un patrón electroforético que comprende bandas de diferentes 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. [12, 25]

1.2.2.4.3. Secuenciación de los productos de PCR

A este método se le conoce como FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequence). Este método representa el método 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. [25]

Aun cuando éste 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 polimorfismo de restricción que permite predecir los perfiles esperados, o el diseño o selección de *primers*.

1.2.2.4.4. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

En el análisis de RFLP –conocido en español como análisis de polimorfismo de restricción– se escogen grupos de enzimas (endonucleasa)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. [14]

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 primer 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 específicas, cortando a la cadena en tantos fragmentos como sitios de restricción sean encontrados.

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 con las endonucleasas⁹.

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'

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. [4, 6]

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, estos 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 solo se quiere autenticar a la especie que cierto producto involucre, especialmente por lo costosas que pueden llegar a ser las enzimas de restricción. [15]

1.2.2.4.5. 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 produce 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 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 en las cadenas simples. [12, 14]

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. [23]

Los análisis SSCP y RFLP consumen menos tiempo y dinero que la secuenciación y son más convenientes para la identificación rutinaria de las especies. [14]

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 simples aún después del RFLP.

CAPITULO II. PROPUESTA METODOLÓGICA

Nota. La metodología y estrategia general utilizada en este trabajo ha seguido las recomendaciones del Dr. Francisco Montiel Sosa. [17, 18]

2.1. CUADRO METODOLOGÍA

El cuadro metodológico utilizado en la experimentación pertinente a este trabajo se muestra en la figura 2.1 mostrado en la siguiente página.

2.1.1. Descripción del Cuadro Metodológico

El objetivo general del trabajo fue diseñar un protocolo para autenticar especies de pulpo y calamar frescos y térmicamente procesados cuya etiqueta declara contener dichas especies, aplicando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basado en la identificación y amplificación de regiones específicas del DNA mitocondrial, para la detección de adulteraciones en los productos procesados.

2.1.1.1. Objetivo Particular I

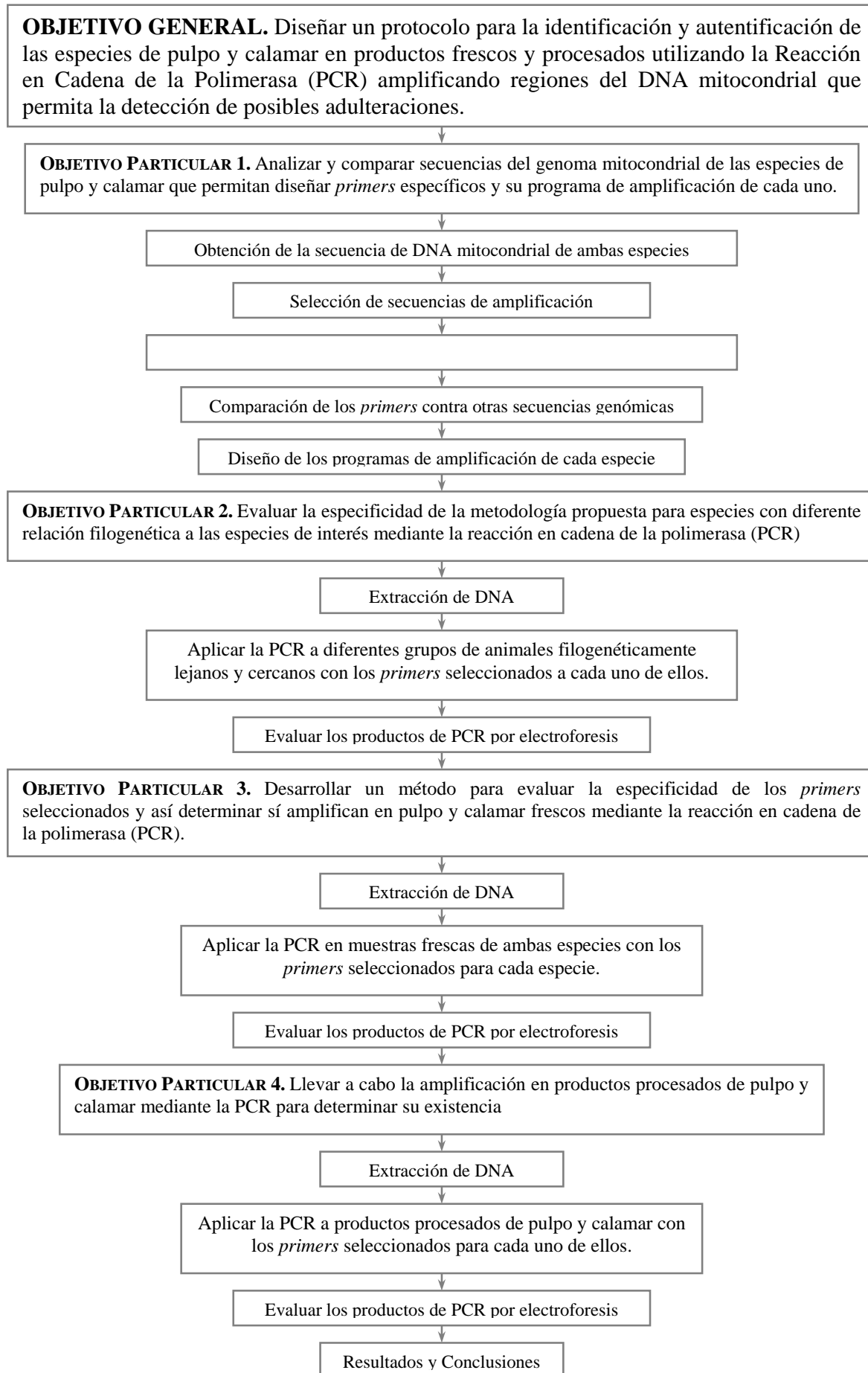
Analizar la secuencia del DNA mitocondrial del pulpo y calamar para la selección del par de *primers* que delimitarán el fragmento diana para la amplificación.

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

1. Obtención de la secuencia de DNA mitocondrial para pulpo común y calamar lanceolado (*Octopus vulgaris* y *Loligo bleekeri*, respectivamente).¹¹
2. Selección y diseño del par de *primers* de acuerdo con los requisitos y recomendaciones mencionadas en la tabla 1.9 en el capítulo I.
3. Comparación de la especificidad de los *primers* mediante el programa bioinformático FastA 3 que proporciona el EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute), que compara las secuencias seleccionadas con las de otras especies.

¹¹ Aunque este calamar (Calamar Lanceolado) no es una especie que se consiga en el mercado nacional, se utilizó su secuencia debido a su disponibilidad en la base de datos de genomas, lo que no afecta en gran medida puesto que se trata de especies de la misma familia.

FIGURA 2.1. CUADRO METODOLÓGICO



2.1.1.1.1. Actividad preliminar

Proponer una técnica para la extracción y cuantificación del DNA total de las muestras objetivo para dar lugar a soluciones listas para su análisis por medio de PCR.

Para esta actividad se ha propuesto 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 proteinazas, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol y la precipitación del DNA con etanol. Posteriormente, a fin de alistar el DNA para la amplificación, ha sido requerida la solubilización de este en agua desionizada¹² y el posterior almacenamiento a temperaturas aproximadas a los -18°C. [16]

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 añade a la reacción. El análisis se hace mediante la medición de absorbancia para ácidos nucleicos y proteínas (a 260 y 280 nm).

2.1.1.2. Objetivo particular II

Desarrollar un método para evaluar la especificidad de los *primers* seleccionados y así determinar si amplifican sólo en pulpo y calamar mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

La especificidad de los *primers* seleccionados se determinan amplificándolos ante especies diversas, como son estos dos grupos de animales, *grupo 1* “especies filogenéticamente lejanas” como son el pollo, el bovino, la res y el porcino; y el *grupo 2* “especies filogenéticamente cercanas” como son los pescados bacalao, salmón y trucha.

La evaluación planteada es únicamente mediante el uso de PCR y electroforesis:

1. Extracción del DNA de cada muestra
2. Verificar si amplifican por PCR las muestras de cada grupo utilizando el par de *primers* seleccionados.
3. Evaluación de productos de PCR utilizando el método de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%, a ~80 V.

¹² El agua utilizada debe de cumplir con dos características esenciales: 1) ser agua libre de impurezas que pueden afectar la reacción o que puedan degradar al DNA durante el almacenamiento; 2) tener un pH neutro para la adecuada conservación de DNA.

2.1.1.3. Objetivo Particular III

De la misma forma se evaluará la especificidad de los *primers* para determinar si amplifican el correspondiente a cada uno de ellos, es decir, sólo el *primer* de pulpo a especies frescas y bien identificadas por sus características organolépticas de pulpo y sólo el *primer* de calamar a muestras de esta especie bajo los mismos términos mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

La evaluación planteada también se hará mediante el uso de PCR y electroforesis:

1. Extracción del DNA de cada muestra
2. Verificar si amplifican por PCR las muestras de cada grupo utilizando el par de *primers* seleccionados.
3. Evaluación de productos de PCR utilizando el método de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%, a ~80 V.

Estas especies de moluscos son los de mayor importancia, puesto que las especies de estos grupos pueden ser objeto adulterante entre uno y otro; y a la vez representan la validez de los *primers* para reconocer dichas especies.

2.1.1.4. Objetivo Particular IV

Por último, se determinará la autenticación e identificación de las especies en cuestión en productos procesados mediante el uso de los *primers* específicos para determinar si amplifican el correspondiente a cada uno de ellos cuando así lo declare la etiqueta.

Para autenticar e identificar los productos de dichas especies se proponen diferentes preparaciones de éstos, como son pulpo y calamar en su tinta, en escabeche, a la mexicana y al ajillo lo cual permitirá conocer la validez del protocolo para la autenticación de productos enlatados ya que sólo amplificará la región específica seleccionada si es que existe; además de establecer las condiciones de trabajo como son:

- Concentración de muestra a utilizar por medio de absorbancia
- Etapas y ciclos para la hibridación de las muestras
- Carga y corrida del gel de agarosa mediante electroforesis horizontal

La evaluación planteada también se hará mediante el uso de PCR y electroforesis:

1. Extracción del DNA de cada muestra
2. Verificar si amplifican por PCR las muestras de cada grupo utilizando el par de *primers* seleccionados.

3. Evaluación de productos de PCR utilizando el método de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%, a ~80 V.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Material Biológico

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

Muestras en fresco

- ✦ Pollo
- ✦ Porcino
- ✦ Bovino
- ✦ Res
- ✦ Trucha
- ✦ Salmón
- ✦ Bacalao
- ✦ Pulpo patón
- ✦ Calamar

Muestras Procesadas

- ✦ Pulpo en su tinta en rebanadas y empacado al vacío (ej. marca Tuny, especie no identificada, Procedencia México).
- ✦ Calamar en su tinta en rebanadas y empacado al vacío (ej. marca Tuny, especie no identificada, Procedencia México).
- ✦ Pulpo al ajillo en rebanadas y empacado al vacío (ej. marca Tuny, especie no identificada, Procedencia México).
- ✦ Calamar a la mexicana en rebanadas y empacado al vacío (ej. marca Tuny, especie no identificada, Procedencia México).
- ✦ Pulpo a la marinera en rebanadas y empacado al vacío (ej. marca Rapaz).
- ✦ Calamar americano en rebanadas y empacado al vacío marca (ej. marca Rapaz).

De cada una de las muestras se extrae un peso aproximado de 50 gramos que deberá ser molido y homogenizado. Las muestras así tratadas se mantendrán en congelación por periodos no mayores a 15 días hasta llevar a cabo la extracción de DNA para asegura una correcta amplificación.

2.2.2. Reactivos y Productos biológicos

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

Extracción de DNA

- ⊕ Agua desionizada o bidestilada con pH de 7
- ⊕ Solución de lisis (Tris base 50mM, pH=8, EDTA 0.1 M, 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 nucleasa
 - PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA Polimerasa, 400 μ M de cada dNTP y 3 μ M de $MgCl_2$)
- ⊕ Pareja de *primers* elaborados por Invitrogen

Electroforesis

- ⊕ Agarosa en polvo
- ⊕ Tris Acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8
- ⊕ Bromuro de etidio en concentración de 10 mg/mL
- ⊕ Marcador de peso molecular de 1 kb
- ⊕ Tinte cargador azul / naranja 6X

Purificación de DNA

- ⊕ Mezcla de enzimas hidrolíticas Exo SAP-IT

2.2.3. Equipo a utilizar

- ⊕ Agitador Vortex
- ⊕ Balanza Analítica Electrónica
- ⊕ Calentador para tubos eppendorf
- ⊕ Espectrofotómetro
- ⊕ Microcentrífuga refrigerada

- ⊕ Termociclador
- ⊕ Juego de micropipetas
- ⊕ Cámara de electroforesis horizontal chica de 16x4x6.5 cm(largo x alto x ancho), con un área de soporte del gel de 7.5x5 cm (largo x ancho)
- ⊕ Cámara de electroforesis horizontal grande
- ⊕ Fuente de poder
- ⊕ Secuenciador automático
- ⊕ Horno de microondas
- ⊕ Transiluminador
- ⊕ Equipo de Fotografía para luz UV
- ⊕ Autoclave

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Extracción de DNA total a partir de tejido muscular.

Para la extracción de DNA de las muestras de alimentos se recomienda el protocolo clásico descrito por Sambrook, J. que esta basado en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinaza, extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico y la precipitación del DNA con etanol, junto con algunas modificaciones. El protocolo completo se describe a continuación: [16]

Degradación del tejido:

1. Enjuagar el tejido con agua estéril procurando no tocarlo con las manos y usar guantes.
2. Congelar una porción del tejido (en nitrógeno líquido o en congelador normal)
3. Moler el fragmento de carne utilizando un mortero
4. Pesar 0.125 gr de tejido en un tubo Eppendorf
5. Adicionar 1.25 mL de solución de lisis
6. Agitar con vortex hasta que se visualicen fragmentos mas pequeños
7. Adicionar 7 μ L 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 mil 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 eppendorf nuevos

Precipitación de DNA:

1. Adicionar 1.0 mL de etanol frío a cada tubo
2. Mezclar suavemente (puede aparecer turbidez y luego desaparecer)
3. Centrifugar a 13.5 rpm por 10 min
4. Decantar el etanol y dejar secar el DNA en incubadora a 37°C colocando los tubos en forma horizontal durante hora y media aproximadamente. El DNA debe visualizarse pegado al tubo como una pequeña mancha blanca
5. Una vez eliminado el etanol, se adiciona 500 µL de agua desionizada para resuspender el 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

2.3.2. 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. [24]

Para cuantificar la cantidad de DNA, las lecturas se toman a 260 nm 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 nm 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. [16, 26]

El protocolo utilizado se describe como sigue:

1. Tomar una muestra de 10 µL de DNA y se adiciona 490 µL de agua destilada, de modo que se conserve una proporción 1:50
2. Realizar las mediciones de absorbancia a 260 nm y 280 nm para cada una de las muestras en el espectrofotómetro con emisión de luz UV utilizando celdas de 1 cm² y 500 µL de volumen. Con los valores resultantes 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 $50\mu\text{g/mL}$, la concentración de DNA se obtiene de la siguiente forma:

$$[\mu\text{g}/\mu\text{L}] = \text{Abs}_{260} \times \frac{50\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{\text{Vol final}}{\text{Vol inicial}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}}$$

Donde la concentración esta dada en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y los términos involucran el valor dado de Abs a 260 nm, la concentración correspondiente a una unidad de absorbancia, la dilución de DNA, que para el caso es $500 \mu\text{L}/10\mu\text{L}$, y por último, el factor de conversión de mL a μL .

2.3.3. Amplificación de DNA

2.3.3.1. Preparación de la reacción

Para la preparación de la reacción es fundamental la estandarización de las concentraciones de los componentes (*primers* y DNA). Los *primers* deben ser solubilizados a una concentración de $250 \mu\text{M}$, mientras que el DNA requiere una concentración relativamente baja puesto que, teóricamente, una sola copia del DNA implica la colecta de millones de cadenas originales.

La preparación de las muestras para la reacción se propone de acuerdo con el protocolo que precisa Promega para el kit de PCR. Los componentes se prepararon en tubos de $25 \mu\text{L}$ como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2.1. Componentes de la PCR, preparación de los ensayos

COMPONENTE	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Mezcla master mix	$12.5 \mu\text{L}$	1X
<i>Primer 1</i>	$0.25\text{-}2.5 \mu\text{L}$	$0.1\text{-}1.0 \mu\text{M}$
<i>Primer 2</i>	$0.25\text{-}2.5 \mu\text{L}$	$0.1\text{-}1.0 \mu\text{M}$
DNA	$1\text{-}5\mu\text{L}$	$< 250 \text{ ng}$
Agua libre de nucleasa	La necesaria para completar $25 \mu\text{L}$	N.A.

2.3.3.2. Etapas y ciclos de la reacción

La programación del termociclador se debe efectuar de acuerdo a la figura 2.2. las condiciones dadas están basadas en las recomendaciones de Promega para la utilización de la mezcla master mix para PCR. La etapa de hibridación debe de coincidir con la temperatura de fusión (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. Un programa tiene una duración total aproximada de 1 hora 40 minutos, con 30 ciclos. [13]

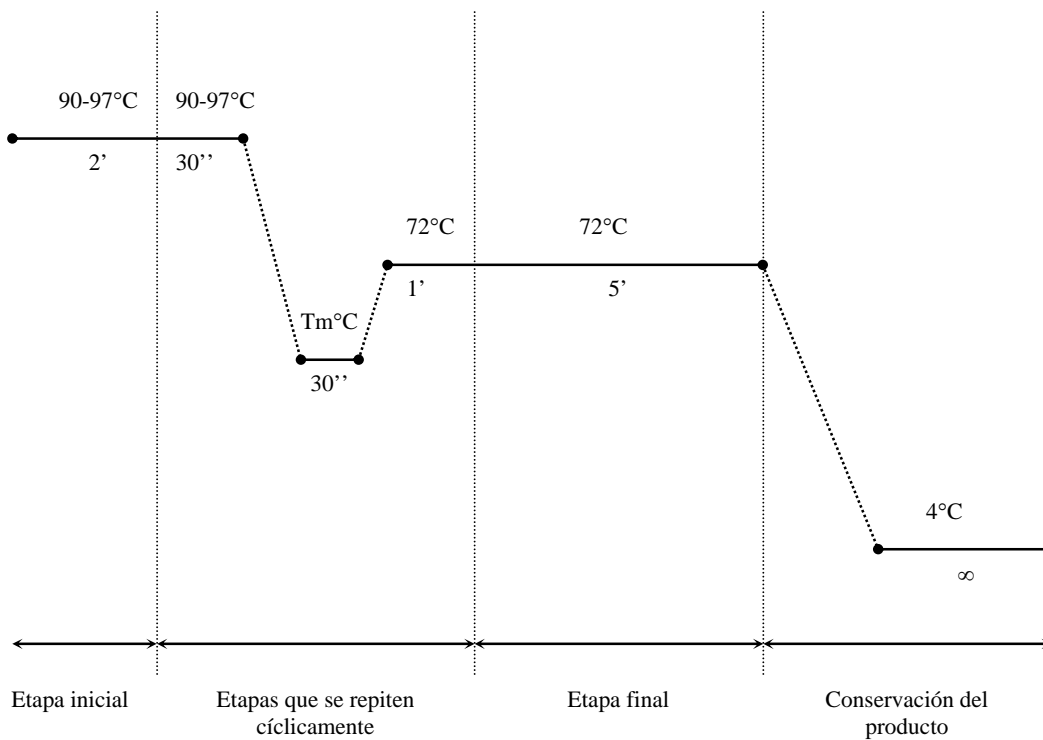


Figura 2.2. Esquematización para un programa en el termociclador

2.4. ANÁLISIS DE PRODUCTOS

2.4.1. Preparación del gel de agarosa

Los componentes del gel de agarosa al 2% adecuado para la electroforesis se mezclan como se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 2.2. Componentes de un gel de agarosa para electroforesis

COMPONENTE	CANTIDAD (gel chico)
Agarosa	0.6 gr
BrEt ¹³ en concentración de 10 mg/mL	2 µL
TAE 50 X	0.6 mL
Agua libre	29.4 mL

El método de preparación sigue el siguiente protocolo

1. Se cierran los extremos laterales del soporte de gel con cinta adhesiva
2. Se pesa la agarosa y se adiciona el TAE y el agua
3. Se agita suavemente e inmediatamente después se pesa dicha mezcla
4. La mezcla es calentada durante 40 seg. aproximadamente en horno de microondas a potencia baja ya que se tiene que desintegrar sin que se pierda al evaporarse
5. Nuevamente se pesa la mezcla y se añade agua hasta que se iguale al peso inicial de la mezcla
6. Se añade el bromuro de etidio y se mezcla bien
7. La mezcla se vierte en el soporte cuidando que no se formen burbujas, en este momento es preciso colocar ambos peines
8. Se deja solidificar el gel en una zona nivelada y libre de corrientes de aire
9. Posteriormente se retiran los peines y se coloca el soporte con el gel en la cámara de electroforesis
10. Se adiciona TAE 1X dentro de la cámara hasta que el gel quede cubierto
11. Se dispone a cargar el gel con las muestras

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 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 [24]

2.4.2. 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 solo 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 (de 50 a 20,000 pb).

La resolución y el grado de migración, si embargo, de los fragmentos de DNA en el gel, dependen en cierto grado, al 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 [24]

La técnica se ha llevado a cabo, por tanto, a 100 V 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 2.3 siguiendo el protocolo contiguo.

Tabla 2.3 Volumen de los componentes utilizados en la electroforesis

COMPONENTE	VOLUMEN
BrEt 0.01 µg/mL	4 µL
Colorante (ficol) 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) 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 colorantes sin que se mezclen.
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 (80-100 V). 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.

¹⁴ Este componente es el buffer de carga del gel que se mezclan 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 que el proceso de carga. Este compuesto contiene colorantes que migran hacia el ánodo en un campo eléctrico

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DISEÑO Y SELECCIÓN DE *PRIMERS*

A diferencia de otras especies, el pulpo y calamar no tienen designados primers específicos por lo que el principal objetivo de este trabajo fue diseñarlos para cada uno, de manera que se pudiera identificar entre uno y otro a pesar de su gran relación filogenética. Para cumplir con dicho planteamiento se llevó a cabo el protocolo mencionado anteriormente en el capítulo 2.

3.1.1. Genoma mitocondrial del *Octopus Vulgaris*

Una de las herramientas que nos da el primer paso para empezar fueron los programas bioinformáticos donde encontramos la base de datos de la secuencia mitocondrial de cada una de las especies en estudio (Ver Anexo). A continuación se muestra en la figura 3.1 el esquema del genoma mitocondrial que corresponde, en este caso, al *Octopus Vulgaris*:

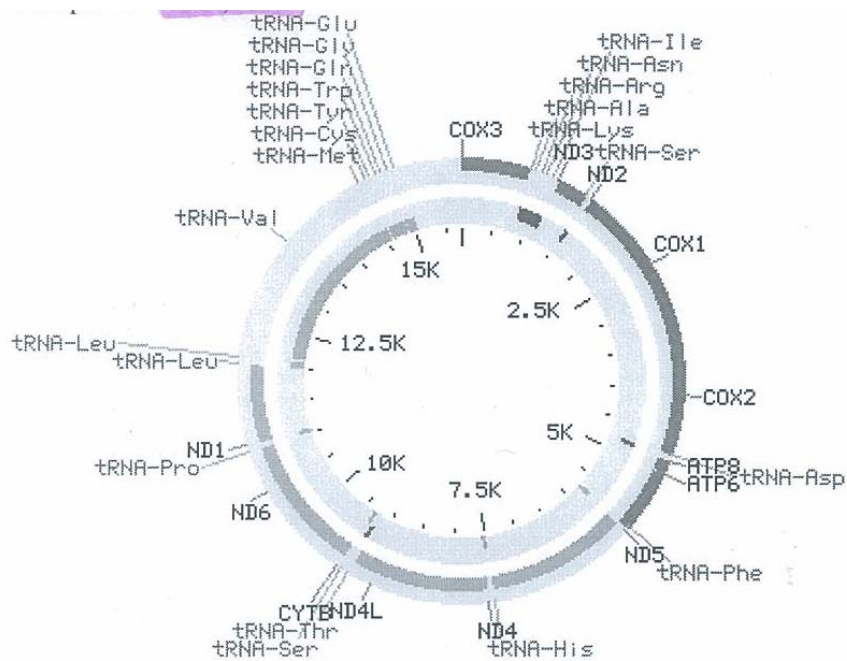


Figura 3.1. Genoma mitocondrial de *Octopus Vulgaris*

Para la obtención de la secuencia completa, y a su vez la del genoma mitocondrial, fue necesario hacer uso de la base de datos Mitomap una vez conociendo datos específicos de las especies como es su nombre científico. [V]

3.1.2. Genoma mitocondrial del *Loligo Bleekeri*

En cuanto al calamar, a continuación se muestra en la figura 3.2 el esquema del gen mitocondrial que corresponde al *Loligo Bleekeri*:

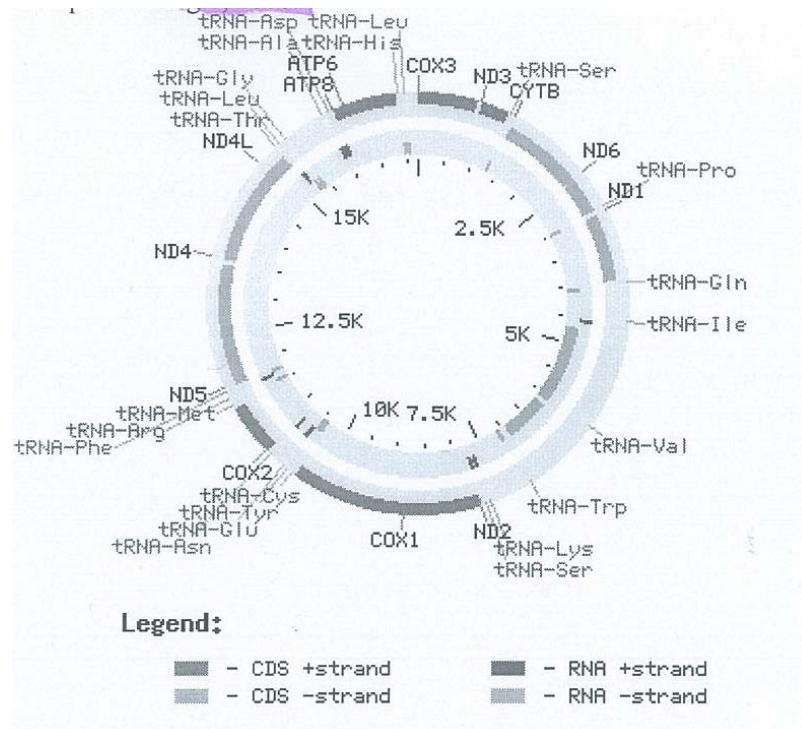


Figura 3.2. Genoma mitocondrial de *Loligo Bleekeri*

3.1.3 PRIMERS PROPUESTOS

3.1.3.1. Patrón A

3.1.3.1.1. Características del primer

A continuación se muestran las propiedades que deberá tener la primera propuesta de *primers* en donde se incluye la secuencia 5' → 3', su temperatura de fusión, la ubicación dentro del genoma mitocondrial y por tanto la posición dentro de este mismo y por último, el tamaño del amplificado que se espera obtener tras la experimentación, además de un programa para el termociclador de dicho patrón:

Tabla 3.1. Características del primer. Patrón A

PRIMER	SECUENCIA	T _M (°C)	UBICACIÓN	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO (bp)	POSICIÓN EN EL GENOMA MT
Pulpo	5' – GAA ATA TAA TGT TAG AAT GAG – 3'	52	12927-12947	256	NADH
Calamar	5' - TTG TAC CTT TTG TAT AAT GG – 3'	52	5851-5870	627	
Universal	5' - CAA ATT ATT ATG CTA CCT TAG – 3'	54	<i>En pulpo</i> 12691-12711	<i>En calamar</i> 5243-5263	

3.1.3.1.2. Programa del Termociclador

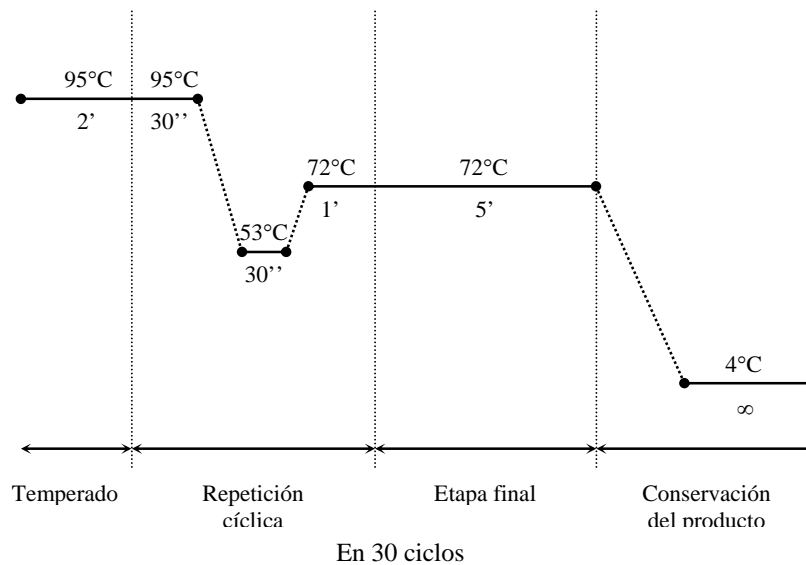


Figura 3.3. Programa del termociclador para el patrón A

3.1.3.1.3. Alineación de primers

A continuación se muestran las alineaciones de los *primers* propuestos contra la secuencia completa del genoma de *Octopus Vulgaris* correspondientes al patrón A. Para su obtención fue necesario hacer uso de otro programa bioinformático que es el Blast [3]

Primer Pulpo vs Secuencia Completa de pulpo

Score = 41.1 bits (21), Expect = 0.018
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1 GAAATATAATGTTAGAATGAG 21
      |||
Sbjct 12947 GAAATATAATGTTAGAATGAG 12927
```

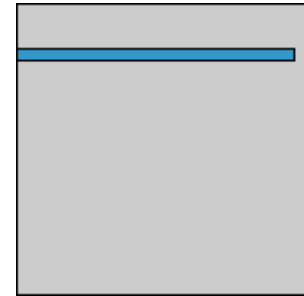


Figura 3.4. Alineación de *Primer Pulpo* vs Secuencia Completa de pulpo

Primer Calamar vs Secuencia Completa de calamar

Score = 39.1 bits (20), Expect = 0.069
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1 TTGTACCTTTTGTATAATGG 20
      |||
Sbjct 5870 TTGTACCTTTTGTATAATGG 5851
```

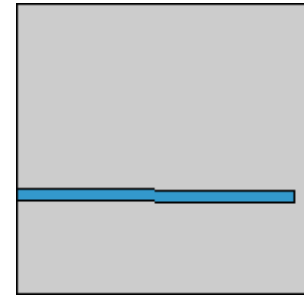


Figura 3.5. Alineación de *Primer Calamar* vs Secuencia Completa de calamar

Primer Universal vs Secuencia Completa de pulpo

Score = 41.1 bits (21), Expect = 0.018
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 CAAATTATTATGCTACCTTAG 21
      |||
Sbjct 12691 CAAATTATTATGCTACCTTAG 12711
```

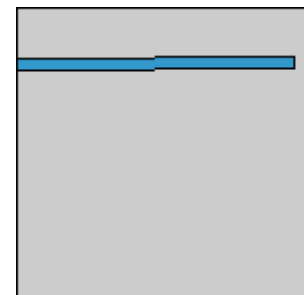


Figura 3.6. Alineación de *Primer Universal* vs Secuencia Completa de pulpo

Primer Universal vs Secuencia Completa de calamar

Score = 41.1 bits (21), Expect = 0.018
 Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query 1 CAAATTATTATGCTACCTTAG 21
 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
 Sbjct 5243 CAAATTATTATGCTACCTTAG 5263

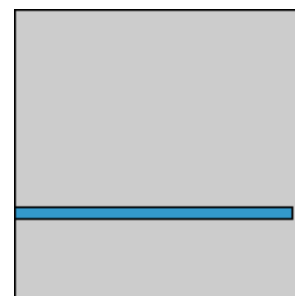


Figura 3.7. Alineación de *Primer* Universal vs Secuencia Completa de calamar

Primer Pulpo vs Secuencia Completa de calamar. No significant similarity was found

Primer Calamar vs Secuencia Completa de pulpo. No significant similarity was found

3.1.3.2. Patrones B

3.1.3.2.1. Características del primer

A continuación se muestra, de igual forma, las propiedades que deberá tener la segunda propuesta de *primers* en donde también se incluye la secuencia 5' → 3', su temperatura de fusión, la ubicación dentro del genoma mitocondrial y por tanto la posición dentro de este mismo y por último, el tamaño del amplificado que se espera obtener tras la experimentación, además de un programa para el termociclador de dicho patrón:

Tabla 3.2. Características del primer. Patrón B

PRIMER	SECUENCIA	T _M (°C)	UBICACIÓN	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO (bp)	POSICIÓN EN EL GENOMA MT
Pulpo	5' - CAA TAC TCA CCC ATA ATT AAC ATC T - 3'	66	10244-10268	296	Cyt b
Calamar	5' - CAA AAA CAA TCC ACT GAG AAC TTG C - 3'	70	2297-2321	380	
Universal	5' - ACA GAA AAC CCT CCT CAA ATT CAA TA - 3'	70	<i>En pulpo</i> 9972-9997	<i>En calamar</i> 1941-1966	

Primer Calamar vs Secuencia Completa de calamar

Score = 48.8 bits (25), Expect = 2e-04
Identities = 25/25 (100%), Gaps = 0/25 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1  CAAAAACAATCCACTGAGAACTTGC 25
          |||
Sbjct 2297 CAAAAACAATCCACTGAGAACTTGC 2321
```

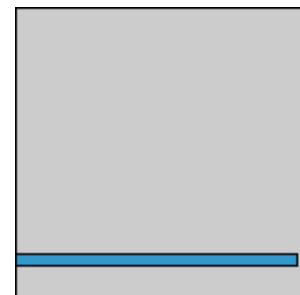


Figura 3.10. Alineación de *Primer Calamar* vs Secuencia Completa de calamar

Primer Universal vs Secuencia Completa de pulpo

Score = 44.9 bits (23), Expect = 0.003
Identities = 25/26 (96%), Gaps = 0/26 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1  ACAGAAAACCCCTCCTCAAATTCAATA 26
          |||
Sbjct 9972 ACAGAAAATCCCTCCTCAAATTCAATA 9997
```

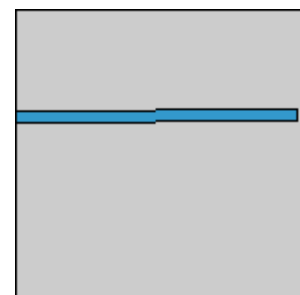


Figura 3.11. Alineación de *Primer Universal* vs Secuencia Completa de pulpo

Primer Universal vs Secuencia Completa de calamar

Score = 50.7 bits (26), Expect = 6e-05
Identities = 26/26 (100%), Gaps = 0/26 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1  ACAGAAAACCCTCCTCAAATTCAATA 26
          |||
Sbjct 1941 ACAGAAAACCCTCCTCAAATTCAATA 1966
```

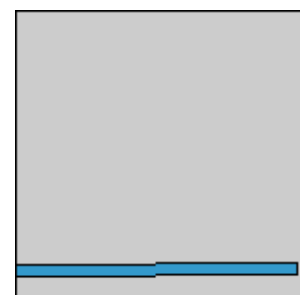


Figura 3.12. Alineación de *Primer Universal* vs Secuencia Completa de calamar

Primer Pulpo vs Secuencia Completa de calamar. No significant similarity was found

Primer Calamar vs Secuencia Completa de pulpo. No significant similarity was found

CAPITULO IV. CONCLUSIONES

Como se puede observar, para ambas propuestas de *primers* se obtuvo una gran afinidad de hasta del 100% en su gran mayoría, a excepción del *primer* Universal vs la secuencia del pulpo que corresponde al patrón B, pero sin embargo esto no es un problema significativo para poder amplificar las especies en un producto procesado ya que esta diferencia no se encuentra ubicada en los extremos del cebador lo cual si podría evitar la hibridación con el DNA de la especie por ser la primera posición.

Pero por otro lado, ambos patrones pertenecen a secciones diferentes de la secuencia mitocondrial de DNA, mientras que el patrón A cabe dentro del NADH deshidrogenasa subunidad 3, el patrón B se encuentra ubicado en el genoma cyt B; es por esto que los *primers* B representan una mejor opción para el objetivo de este trabajo ya que como se mencionó anteriormente se ha demostrado que la zona del citocromo b del DNA Mitocondrial representa un alto contenido en mutaciones que permite hacer posible la localización de sitios de restricción específicos de las especies buscadas que a su vez no se repitan en otras especies.

Sin embargo, los *primers* que corresponden al patrón A son los que tienen mayor diferencia de pares de bases en el tamaño del amplificado entre cada una de las especies, lo que hace más fácil identificar entre uno y otro a la hora de amplificar en un gel de agarosa.

Por esto y por toda la información ya mencionada se puede concluir que se logró cumplir con el objetivo de este estudio ya que se presentan dos estrategias diferentes de amplificación haciendo una comparación entre los dos patrones propuestos y que ahora es posible llevar a cabo la etapa experimental a nivel laboratorio.



REFERENCIAS CONSULTADAS

1. Alimentaria online <http://www.alimentaria.com>
2. B. Holland, J. Brown y D. H. Buss. Fish and Fish Products. The Composition of foods. Royal Society of Chemistry. Ministry of Agriculture, Fisheries and food (MAFF). Cambridge, 1993
3. Bernales, S. O., et. al. The Complete Nucleotide Séquence of the Mitochondrial DNA Genome of Octopus Vulgaris. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accesado en Octubre de 2005
4. Bossier, P. Authentication of Seafood Products by DNA Patterns. Journal of Food Science. (64), 2. 189-193. 1999.
5. Carol Ann Rinzler. The New Complement Book of Food. A Nutritional, medical and culinary guide. Facts On File, Inc. New York, 1999
6. Carrera, E. et. al. PCR-RFLP of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase Gene: A Simple Method for Discrimination Between Atlantic Salmon (Salmon Salar) and Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss). Journal of Science of food and Agriculture. 79, 1654-1658. 1999
7. Etienne, J. Bioquímica Genética, Biología Molecular. 3ª Edición. España, Masson, 2001. 491 pp
8. FAO Fisheries Departament, Fishery Information. Data and Statistics Unit. www.fao.org. Accesado en Mayo de 2005
9. Günter Vollmer, Dieter Schenker, Norbert Vreden. Elementos de Bromatología descriptiva. España 1999
10. Hold, G.L. et.al. Development of a DNA Based Method Aimed at Identifying the fish Species Present in Food Products. Journal of Food Quemistry. (49), 3, 1175-1179. 2001
11. J. J. Connell y R. Ardí. Avances en tecnología de los productos pesqueros. España, 1987
12. Lockley, A.K. y Bardsley, R.G. DNA Based Methods for Food Authenticacion, Trends in Food Science and Technology. 11, 67-77. 2000
13. Luque, J. y Herraez, A. Biología Celular e Ingeniería Genética. Madrid, España, Harcourt, 2001
14. Mackie, I.M. et. Al. Challenges in the identification of Species of Canned Fish.

- Trends in Food Science and Technology. 10, 99-114. 1999
15. Métodos de Identificación de Especies Animales en Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. www.ucm.es/info/complutecno/fichas
 16. Meyer, R. y Candrian, U. PCR-based DNA Análisis for the Identification and Characterization of Food Components. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 29, 1-9. 1996
 17. 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
 18. Montiel, J. F. Variabilidad Genética del Clado Mitocondrial y Astenozoospermia Humana. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España, 2002. 193 pp
 19. Olga Moreiras, Angeles Carvajal. Tablas de composición de alimentos. Madrid, 2004
 20. Page, L. M. y B. M. Burr. 1991. Publicación Electrónica en World Wide Web. www.cephbase.org, versión (10/2004). Accesado en Octubre de 2005
 21. Pesquería de Calamar y Pulpo <http://omega.ilce.edu.mx>
 22. Peter A. Whittaker y Susan M. Danks. Mitocondria: Estructura, Función y Formación. School of Biological Sciences. España 1982
 23. 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
 24. Sambrook, J. y Russel, D. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. EUA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
 25. Sotelo, C.G. y Perez-Martín, R.I. Species Identification in Processed Seafood, Safety and Quality Issues in Fish Processsing. Inglaterra, Woodhead Publishing Limited. 2002. pp 450-474
 26. Widmer, F. Y Beffa, R. Diccionario de Bioquímica y Biología Molecular. España, Acribia 2000. 247 pp
 27. Zdzislaw E. Sikorski. Tecnología de los productos del mar. Recursos, composición nutritiva y conservación. España 1990

ANEXOS

Genoma mitocondrial completa de la especie *Octopus Vulgaris*; posteriormente se señala en color azul la secuencia que corresponde al gen *cyt b* que comprende del pb 9346 al 10483:

1 atgactcgaa atccattca tttagttgaa tftagaccct gaccattaac aggatccata
61 agagctttat tttaacaac aggactttcc tcatgattc acaattatga aaataccctt
121 atttttttg gtttactact tataattta accataattc aatgatgacg tgatattatt
181 cgagaaagta cattcaagg ctccacaca tctaaagtat ataatggcct tcatgaggt
241 ataatactct ttattattc agaagtatgt ttctttttg cttcttttg agcctattc
301 catagtagtt tagctcctaa tatagatatt ggatcatgtt gacctcctat ttatatttt
361 ccccttaate ctttccaaat tcccttatta aatacagcaa tcttgtagc ctccggtgta
421 tccgtcacct gagcacacca ttcactaata aataatgatt taaaatccgc aactcactct
481 ataattatta ctatttctt agggttttat ttacaatcc tccaaatatt agagtatata
541 gaagcatcat ttctatttc agatagaatt tatggttcaa ctttctttgt agcaacaggt
601 tttcacggct tacatgtaat tattgatca accttcttc taatatgttt attacgaatc
661 ttaataaate attttcttc ttcacacat ttggattcg aagctgcggc ttgatactga
721 catttttag acgtagtatg actatttta tatactttg tatattgatg aggttcataa
781 aataattatt attaacttta ttaagtggct gaaaccaa atgactaga cttttaatct
841 agctatgatt atataatct taattggat tatattttat ataagaaa ttaactgca
901 attaaaaagt aataactaat ttatttaata ccaatcaaga aatgaatttt catataggt
961 ttcgacccat aattaggtaa tattttacc cttgttcag tgaagagcca aaataagcgg
1021 catttaactg ttaattaa aactgaaata ttttattct tcaactggagt atagcggcgg
1081 aatgaacgga ttatattgat gtataaatt ataagaaaa ttacttcta tacttatgta
1141 ttcttttct ctatttgcatt tatttcttat taccctaat gttattttat ttattattag
1201 atcattaatt atatttaaaa ataataaaa ccgtgaaaaa aattctcctt tgaatgtgg
1261 tttgacctt tcatgatata ctgatctcc ttttccatg cgttttttt tattagcagt
1321 aatttttcta atctttgacg tagaatcat ttatttaata ccaataatta ttaacctctt
1381 atttcaccc tcaactattt atttatcctc ctctataact ttctcatta tcttaattat

1441 tggattactt catgaatgaa atcaaggatc cttaaattga atataagagt aataatgtg
1501 atataataa gctgctaact ttattatgag caatcataa ttgtactact cttatgaac
1561 aataaatttt tcctgcaa ttttatattt attatcataa taatcatagg tacaattata
1621 tttttatcat catctcattg gctaataata tgaataggct tagaattaaa ttaatatga
1681 attttacccc taataaatat taaatctaaa aattttgaaa tcgagagatc tataaaatat
1741 tttattatc aatcaataag atcatcgta ttattagaa gatcaatctt tatatatata
1801 tctcaattt ctatattctc aatattaat aactctttat tctcccctat tataattatt
1861 tctctactaa ttaaattggg aagagctcct ttcatttct gactacctc tatatgtaa
1921 caaataagat gactaatatt attttaatt ttaacatgac aaaaattagc accattatt
1981 atattgtctt tcattaactt taattatatt attataatcc taccagcttt cataagtct
2041 atcttaggta gaattcaagc tattaatcaa tctagcctac aattaattat agtatattca
2101 tcaatttctc atttaggatg aatattaccg atctgcttta tcaataattt tcaatattc
2161 aattatctac taatttatac aattattatt ctcctatat ttattacatt ttctataaaa
2221 tcaacctttt tcacatactc attaacagaa caaaatata atataataa agaaaacatc
2281 tcaccataa tattaatttt atcccttgca ggtattcccc ctacattagg atttctatca
2341 aaactaatag ttctcaactc actattaaat ataaataga ttttattatc ttattatta
2401 tttttggaa cccttattag actatatttt tatctaaatt taataatact actaataatc
2461 aaatcattct ttatatttaa aacaataaaa ataataaaa atataaaatc aattatattg
2521 ttaatatat taggaacaat ttttttacc ccaatattac tatatgcgat gaatttctc
2581 aacaatcat aagatattg gtacactata ctctatttt ggaattgat caggactttt
2641 aggtacctcc ttaagtttaa taattcgaac agaactagga caaccaggat cctctctaaa
2701 tgatgatcaa ttatataatg taattgttac agctcacgca ttgttataa ttttttct
2761 tgttatacca gttataatcg gaggattgg aaactgattg gttcttttaa tactaggagc
2821 accagatata gcattcccac gaataataa tataagcttc tgactcttac ctccttctc
2881 tactcttctc cttcatctg cagcagttga aagaggcgca ggtaccggat gaaccgttta
2941 cccgctctt tcaagaaatt tagctcatat aggacctct gttgatctag ccatttctc
3001 acttactta gcaggtattt catcaatcct tggagccatc aactttata caactattat
3061 taatatacga tgagaaggta tattaataga acgacttcca ctattgtat gatctgtatt

3121 tattaccgca attttactat tactatcatt accagtactc gctggagcaa ttactatact
3181 tttactgac cgaaatttta atactacatt tttgatcct agtggaggag gagatccaat
3241 tctatatcaa cattttttt gattctttgg tcaccagaa gtatatatc taattttacc
3301 aggatttggg ataattcac atattgttc ccattattct ttaaaaaag aaactttcgg
3361 aagactcggg ataactcag caatattatc aattggactc ttaggattta ttgttgagc
3421 acaccatata ttacagttg gtatagatgt agacacacga gcatattta cagccgccac
3481 aataattatt gcaattcca caggaattaa agtatttagt tgattagcta ctatctatgg
3541 tcccctatc aaatacactc ccccattgt atgatcatta ggatttttt ttctattac
3601 tactggagga ctaactgga ttgtctatc taattcatca ctagatatta tactccatga
3661 tacatactat gtagttgcac attccatta tgtattatct ataggagctg ttttgcctt
3721 attgcagga ttaccact gatatcctct aattacaggc ctatccttaa atcaacaata
3781 taccaatcc catttctaca taatattcat tggagtaaat attactttct ttccacaaca
3841 ctttttagga ttagcagga taccacgacg atattcagat tatcctgact cctacaccaa
3901 atgaaatata gtctcatcta taggatcact ttatcacta acttccatta tatttttcat
3961 atttattgta tgagaaagat taatttccca acgaactatt atttgatcaa accacttaa
4021 tacatcttta gaatgagaca accgtctcc agtcgatttt cataatcaaa tagaaactgg
4081 agccttattt atttaattta aaataatag acccaatgag gacaattagg atttcaagat
4141 gcaaattcac cccttataga acaacttatt ttttccatg atactctat atttattcta
4201 attatcatcc taacattagt tatatatatt acagttttat taataacaaa caaattttct
4261 tcattaataa ttacagaaag tcaaaaaatt gaaacaatct gaacaatcat cccagaatc
4321 atcctacttt tectegcact accatcttta aaattacttt atttactaga tgaatctatt
4381 aatccacttc ttacaattaa agcactagga caccaatgat attgaagata tgaatattca
4441 gattttataa atattgaatt tgattcatat ataattcctt taaatgaact aaatgaaggt
4501 tcattccgac ttctagaaac agaccatcat ctaattatc caataaaaaa aaatactcga
4561 ataattattt catccgcaga tgttattcat tcctgaactg tacctcttt aggtattaaa
4621 gtagatgcta tcccaggtcg actaaatcaa ttaaactttt attccaatcg acctggatta
4681 tattatggac aatgctctga aatttggtga gcaaaccact catttatacc aattcactc
4741 gaaatcgtaa acataaacac ttttaataac tgactattaa atataaatac ataaaaagtt

4801 agttaataaa ataacataaa tttgtcaaat ttaaactact attttatag tacttttat
4861 atgccacaac ttccccttt aaattgaatt atacttttt ttctctttg attttact
4921 ctccctaact catctatcat atgatgaaat aataaaaata aatatcattt aatagaccaa
4981 aaaaaataa caaaaaaac aaaatataac tgataaatg atagtagata tttttctt
5041 atttgatgat cataactcaa caacattata tcttcattct ctacatgaa tcttaccct
5101 atgatctctc tttttatca attctcatt ctgaatttt ccttcacttt tcaactctc
5161 tctaataac ccaaaacaaa ttattaacat ccaaactact cgatctttta gaataattt
5221 agggagctt ctactcatca tctcatcatt attttaata attattaatt ttaacctct
5281 aggcttaatt ccttatgtat ttagaactac tagtcattta gctatategt tctctctc
5341 atttccatta tgattaagat taatcattc atcctatcaa aataatagct attcaccct
5401 cgcactctt ctacctcag gtactcctc gtttctaac cccttctac ctctaattga
5461 aattataagt attagagtc aaccttaac tttagcaatt cgaatcgag caaacattag
5521 agctggacat attatctaa ccctaactcg tgacttctta tcatttcat taattaatac
5581 ttctattac tcaacatcaa ttgtttaat agtacaaatt ggtatttta tcttgaat
5641 tggattgct attattcaag gtatatatt ctcttatta attactttat actctgataa
5701 tcaccaattg ataaactaa aaaacattta ttctactta aagataatac taccacctta
5761 acacctcaa cgctatgctc ttcaattaa gctatttaag taaatcataa aaataatata
5821 aataataata attatattaa tattaataa aacaatcac caccattcca ttatatat
5881 aacttttta ataattataa gtattccctg acctcctaat atttctaate atcctatc
5941 caccaactt aaatttat tagtaatt ctttattt aatataaatg gatatcccct
6001 taaagaagat ataaaccaca tttactatt acaccaatat attaatctat aattaattt
6061 taataattta ccacctcata atctaaaaga taatattaat ctaaataaca ataataattc
6121 taccaacatt ttatataata aaggtaaac aatcactca taaaatgaa taacaattt
6181 ttgtaataa aatccccaa ataaagcacc tatacacia accaccattg atacaataat
6241 atataaatta tcatctcca tatttcata tacacctctt ttacatccc ctactactac
6301 atacatagat atacgtaatg aatacaatat agttaaact accccaaata acccaataa
6361 actaatcaac atattaatat ctctacttaa taaaattca ataattaaat ctttgaata
6421 aaatccagct aaaaacggaa acccacataa cgccatattc gagatattaa gaataattct

6481 agtaaaagggt aaattatatac taactccctt aatatctcga atatcctgag caccacaata
6541 acaatgaata atattacctc cacataaaaa caacaaagcc ttaaacatag catgagtata
6601 taaatgaaat aaagctaata taggtatctt tattcccaaa gacattatta taaccctaa
6661 ttgtcttaaa gtcgataaag caataatctt ttttatatcg tattcataaa tagcacaac
6721 ccccgatata aaagtagtta taattgaaat aaactata aaattacaaa aataatttac
6781 ttcaactaaa taattataaa accgaattaa taaatatacc cccgctgtaa ctaaagtaga
6841 tgaatgtact aaagctgaaa ctggagtgg tgctgctata gcagcaggta atcaactctt
6901 aaaaggaat tgagccctct tagttatcc agcaataacc acaaaaatta tacaatatc
6961 aataaatcaa aaatacaaa tacataaata atttcaatgt cccaataatg acataatctt
7021 aattccagcc aaaataaac aatctccgat cggatttatt aatactgta atatactgc
7081 acttagtgat ttatttttt gataataaat tactaaacaa aacgatacct aacctaatcc
7141 atctcatctt aaaattaaac taacaaacct aggaataaaa atcaaaaaat ttatagataa
7201 aacaaataac atcaatacca ttataaacg cftaacatta acatctccac ttatatacct
7261 aactctaaaa atacatactg atctagaat caacaaact aatctactaa aactacaact
7321 aactcaatca aataaaacat ctaattcaac aaacaacctt attacattaa aaattccca
7381 cgaataata taacaataat tatttaaaat taaatatata aatataatta taaatataaa
7441 agagactgat attaacacaa cactaaaaaa aattccaac ttaatttat tcatagtaaa
7501 ataaattaac ttttctcta agcccacaac ctagtatttt cacataaact aattttacta
7561 ataataaaa atcaatacct ctaatatatc caatattcaa aataaatatt aataaaggaa
7621 taatatgtaa tactaacaat aaattttcat tctttttatt aacatttaa acttttataa
7681 atcttateat ctgacctga tctaccgtaa cataaaaaac caaattatat aatcctccca
7741 taaatactat tattaacaca aaaaataata aatataatct atatatatat atagaaatat
7801 ataacataat ttcactaacc aaattgataa atggaggagc tcctatatta caaacacata
7861 ataaaaacat taataaactc atcataggat tataattaat tattcctcca cataaaaaata
7921 atcttctctt attaactttt tcataaatta agtttctaa acaaaaataaa cccgaagaac
7981 ataactcatg acaactatc atcaaaatag cccctctca accaataata aacctctaa
8041 ttatccccgc taatattacc cccatagac caatagaaga ataagcaatc aatcttttta
8101 tatcctctg accaacacaa ataacagaag ttaataaacc tccccataaa caaataacaa

8161 ccaataatac tatatgacta ccacctaana acttaataa cccataaat cgtataattc
8221 catacccacc taattcaat aatacactg ccaaaattat agaccagaa ataggagcct
8281 ctacatgagc tttaggaat cacaaatgaa aaaaataaat tggtaattt accaaaaaag
8341 ctaataataa accaataact caatataacc taatatcatt aataacaac aatttaatta
8401 aatctattct atagatcct tctgatatc cccacaataa taaacacaat aataaaggta
8461 aagaagcact tactgtatat aatattatat atatcccagc ttgtaaacgc tcaggttgat
8521 agcccact taaaatcaac aacaatgtag gaattaatga aacctgaaa aataataaa
8581 atataataa atttctacc aaaaaaaca caattactac aaaacatagt aataatac
8641 aaaaagaaa aatctcacc ttattataa tctttttac tgattataa ctagataata
8701 atataaact actgttcaa aatcttaata ataccaaaat catcgatacc ttatctaaag
8761 aaaaataaaa ctcctcacc cccctacaat caatatttaa atatttaac tcataaaac
8821 taaaaataa tataaacat aaacgcaact ctcactcaa ccaaaaatc aacaacaata
8881 atataataa tcttataat attcctataa ttataaact cttaaactca ttacgtaac
8941 attaccatgt aaacgaataa aactaactaa taaagataac cctaaagaag cctcacaac
9001 tccaaaaca acgacaataa taaccaaata caaattcaat ctactacac ccacagaaa
9061 aaaaataata gaaattactc ttaatgtcaa cacctcaaaa cctaataaga tattcaaat
9121 atgtttccat tgaataata aacaaataa accacatata tatatatata ttcttaaca
9181 taaacaatta ttataatca tacacgttat aatagttat ataaaacatt ggtctgtaa
9241 accaaaata aatattttat tttataact attctttta aaggftataa gtgaatcgaa
9301 cactataaa aggtttcaa aacctatatt tatccaat aacct**aataa tctaataat**
9361 **atattcataa tatatctaaa ataggcga taaaaaaca agtaaaatataaaaaccta**
9421 **aaatacagacc aattattca tatggatatt ctactggaca actccaatc catgttaaaa**
9481 **taaaaaatac accaattaaa aatcaaaaac aaaactgtcc taaaaaatta taacacaac**
9541 **ctatacatcc tctaactgt aaaaatggac aaataaaca aacaacaata gatattccta**
9601 **aactaactac tcccctaata ttattaggaa tgaacgcag aatagcataa gcaacaaaa**
9661 **aatatcactc aggttaata tgaataggag taactaaagg attcgcagga ataaaattct**
9721 **cagcatctcc caatatatta ggaataata aactaactc aactaacga aataatatta**
9781 **caagaaatcc caaataatct ttatgtgat gataatgat aaaaggaatc ttatctaat**

Región Cyt b



9841 **ctctatftaa tectaattga ttattfgaac ccccttcatg taaaaacaaa aaatgtaaaa**
9901 **taaccaacce cacaataata aaaggaaaca aaaaatgaaa acaaaaaaat cgactcaaag**
9961 **tagcattatc aacagaaaat cctctcaaaa ttcaatatac taaaacctcc ccaatatatg**
10021 **gaacaacaga tactaaatta gtaattactg tcgccccca aaatgatatac tgacctcaag**
10081 **gtaaacata cctfacaac ccagtaata taacaaaat atataataat accccaatat**
10141 **ttcaagtata aatacttata taagaacat aatataaacc acgaccaata tgtatatata**
10201 **aaaaataaaa aaaaaaagat gccccattag catgaatata acgcaatact cacccataat**
10261 **taacatctcg tataatattg attacagaat caaagaata ctcaatacat gatgtataat**
10321 **gtatagcaag aaaaataccc ctcatcaatt gaataactaa acacaaacct aataaagaac**
10381 **caaaatttca ccaataaac aaattaacag gfgatggtaa atcaactaat gctctattta**
10441 **caatctgcaa aacaggatga gttttcgtat atgaactaag cat**atttata tttaaact
10501 cgtaacggcc cctcacaata ataacaatt ttaacaactc tcacaaaaac taataacaat
10561 aatacaccta aaaacacata acaaaaaaaaa ttaatcttc ttattaataa acttgatata
10621 cctaattceta aaaattaac ctccattatc ttattacc tcatattaac atccaataa
10681 taatatatag aaattatatt catcaaaaaa aaagaaagaa atccaacca catatatata
10741 attaatccct tagaaaaaaaa aatcaaatga ggaataagac taataatata tataaatatt
10801 actaataaac cacctacata caccaaaaat aatatataac catatcaaga ataaataaaa
10861 aaagaaatca aaatctcat aaaaatccta actaatataa ttataaatcc taatctcaac
10921 ggttgaaata aaataattaa taaactaaca atagaaaacc ctaacgaaaa atatattatc
10981 aataccatat caaaaaataa aatatcattt taatctataa ctccaatgt tattatttta
11041 attaaactat ttttggatt tataaataaa acattattt actaaacact ccaacaaaga
11101 ttaaaattat taatacacat ggtaaatacc tcttccaat tagatatatc aataaatcat
11161 aacgatatcg aggataactc gcacgaactc aaataataa aaatctaac aatcctacaa
11221 ttaagtatac agaaaacca atagaaacgc ttaaaaatcc tctccaaaa aataacactc
11281 cacataaaaa cctcataaat aaaatattac tatactcagc tataaatagc aaagcaaatc
11341 ctactctcc atactcaaca ttaaaactg aaactaactc tgactccctc tcagcaaat
11401 caaaaggagc tcgatgagtc tccgcaatta tcgacacaac ccacattata aatataaaaa
11461 aattaacaaa aaaaattcaa caaatatact gatattttaa taaattact aaactaatac

11521 ttcccaccaa caacaacaa ctcattaaaa ttaaagatat cctaacctca taagaaattc
11581 tttgagcaac tgcacgcaca gaccctaata aagcatactt agaattggaa aatcaaccgg
11641 cacccataac acaataaaca ccaatactag aaatacataa aaacatcadc atacttatcc
11701 cccccatcct tacaaaaaa tatccattat ataatttca caaaaataaa gcaaaaaata
11761 aacttaaaaa tggacaaact aaaaaggga aataattaac taaggtaggc ttaatatact
11821 tttttctaaa taatttaatt gcactgata aagggtgagg taatcctatt aaacctactt
11881 tattagacc tttacgtaac tgaaaatate ttaatccttt tcgctccaat aatgtaaaaa
11941 aagcaaccgc caataatgca gaaatacatg caaccacata cgaaaccaat tcaacaaca
12001 ttattaagag aaaataataa aaatttccat aataggatct taaatcctac acactaatct
12061 gccatcttaa tataaagtaa aagttatact ttataaaaat aatcctaaat tattcacata
12121 tttctgcaa ctttatccaa tatttataaa attaattaaa aacaattaat cataatcaat
12181 cctttcgtae taaatcaaat aaaaaataa tftaaaagat aaaaaccaac ctggttttca
12241 cgggttgaa ctcagatcat gtaaaatttt aaaaatcgaa cagatttacc taataaagcc
12301 tctacacctt aaggtaatt ttaatccaac atcgaggctg caatctcttt ttcaaatg
12361 aactetcaaa aaaaattacg ctggtatccc tatgtaact tatctctaa gcaaaaaact
12421 tggtttattc ttaactaaa tftaaaatta aggaagftaa taaaacactt taaattaatt
12481 tttatctct gatcacccca accaaagfta tftacaata aatcatatat atatacatat
12541 atatatctat ataataacaa aagctcaata gggctctttc gtcctftaa ataattaaag
12601 ctttttact ataaaaatta atttctaata aataaaatag agacagftaa attctcgtca
12661 aaccattcat tctagcccca atftatagag caaattatta tgctacctta gtacagttat
12721 aataccgcag ctgftaaata ttaatcaccg agcaggccca actcttcatt aaaaaactc
12781 aaagagacat gttttgata aacaggcgaa atftatcctt gccaaattcc tftaatttac
12841 tftaatatat aaacctatat ftatattaat taactftaaa tftaaatact aaaaataaaa
12901 ctaattatat ataccatcca aaaaactca tftaacatt atatttact tttataatt
12961 aaaagatatt tatccaactg ctataaagaa aatttaataa tataaataac attaaaaata
13021 acaataaaga aaaaatatta attcaacttc aattaatcat cttattatat acattettac
13081 aataatatat gaagcttadc ccccaatact taaactaaaa aaactacca ccataataa
13141 tttttaacta acactaaaa gtaaaaaata aaaaactagc tatcatacaa atcgaatagc


13201 atttactac catttactct taaaataata actttaccac gttactaca cataaaatac
13261 tactaaaaa aataaatctt catatttcca gaaaattata tccataaaat aatattatta
13321 aaccattatg caaaaggtac aaaacttaa tttactata actaaattca caaaattcta
13381 catccttctc agtacatata aataaatatt tctatacca ttactttaa atcaaaaact
13441 tttatcaata ctctactca aaataaatat caaaataaaa acccaatcta aatcaaaaat
13501 aatttaata aaattatcct ctcaacgtaa gtgagacaca ttacaattat gttattttt
13561 gtattatata ctctccaga aacaatttc attactcta ctatgttacg acttatcta
13621 tttaaacaac aagagtgacg ggcgatatgt acacttaca aaaccacatt caactacaca
13681 tactaataat caagtttact atcaagtcca cttactaac aaaatfaat ttcattatc
13741 cggataagta aataatataa attatagtag tccattaaac ctctttatc agctacatta
13801 tgacttgaca tataaatcct aaaattcaaa agtccttta ttctaaaat ataaactgcc
13861 gacagcaata tataaacctg tatatatata tatatataat tcaaaaaaaaa gtaagttaa
13921 aatgtggatt atcaaatat attaacaac tcccctaact ggatagttaa aaccgcaaaa
13981 ccttttaagt tftaacaac aatcaataac taactatctt agtcatttc ataactta
14041 ggtaaacaaa atcaattttt acaataagaa ataatagggt atctaactct agttttttt
14101 caaaattca aagtattaac aataaagaaa aacacaaaca aacaagctaa ttctaaaaat
14161 tttacaaaa acccaactat ataattttct tftaaaagaa aattgtctta ctttacttta
14221 aacaaaaaac ttttaactt aattataagt ataaccgcag atgctggcac aaatttatcc
14281 aattataatc tataatttct atataaaact ctcatctatt gtataataa atatactgaa
14341 atatcaatta acatattaa aaccacttaa tattaataa aaagtacct tataataat
14401 attaaacttt actataataa atacaaaata aatatcaaca taaaagcgca atatatatat
14461 atatatatat atatatataa taaacctaac atgtataaaa ttataataat taaaaacaaa
14521 accaaagtca aattaatata tataataaag agacaataca aatctattt tcgaggtatg
14581 aaccaatag cttacttagc ttactttatc aaaacaagt ttaacataaa catgtatctt
14641 taaatttga atttaatat ttaattaa tataaacca tgagaaagta aacactata
14701 aatagatta caatctaccg actaaaaatt tcgaccacct cacacagaat ttaaataaa
14761 ttatctattt aaagcttga aaacttttag tftaatttaa ctfaaaactc tttacaaaa
14821 aaggacttga accttttct taaagatcaa aactttatat gccacatac caaatcataa

14881 atagtctatt tcatttaaat aaatttaaac caattgttg gaaaacaatc atactctta
14941 tactaataaa accgaatact ttgataata tacataataa ttattattcc taaaattga
15001 aaatcttcg tgcaaattac accacaaaaa tattaagata tgtatataat atacaagtg
15061 tataactcaa tattctaaaa aactatattc caataacaag atatttatat aatttattac
15121 aaaacacaaa tagaatttat aaaacatagt tacaaaaata atctatacta atcatttta
15181 tactcaaca caaatagaat ttataaaca tagttacaaa ataaatctat actaatcatt
15241 tttactca aacacaatat aatttatata ccattaagaa acttaattat ttctgtgata
15301 tttatataat atttatatac tacatataaa caaacaaga attaagtata tttatcctga
15361 gttacatcca agtataaaaa tcaaccacca cagaccccaa ttatcaattt ataaaataca
15421 taaatataaa tttacatatt atttataact tttattaca aaaatcgta atttaataaa
15481 aatattaaaa atatatagaat tattttaag atgcttatct cactttaaa aacatcaatt
15541 tttcaaaacc aacgaagatt tcatgtaatt gtattaatat ataaattatt gtatatacta
15601 tatacataaa actaacattt tttaaacac cctcaccccc ctctttctc ttgacaaaaa
15661 tttgcccttt ttgatcata catctaaatt tgtccaattt ttgcaatat attaaactc
15721 ttttaataaa tattattatt attt

Genoma mitocondrial completa de la especie *Loligo Bleekeri*; en color azul se señala la secuencia que corresponde al gen *cyt b* que comprende del pb 1313 al 2452:

1 atgatccgaa atcctttcca cttagtagaa tatagtcctt gaccctaac aggetcacta
61 ggagctatat ttttaaccgt aggattaacc tcctgattcc ataatacagg ttttattact
121 atacttttag gtttattctt agtattaata accatatttc aatggtagcg tgatattatc
181 cgagaaagca cattccaagg ttatcataca ataaaagttt cacttggcat acgaataggt
241 atggctcttt tcattacctc agaaatctgc ttctctctcg ctttttttg agcttatttc
301 catagaagac ttgccctaa cacagatatt ggtgctagtt gacctccct tcatattaac
361 cccttaaacc ctttcaaat cccctactt aatacagcta ttctattagc ttcaggtgac
421 accgtcactt gagcccacca ctcaataa ggtggaaacc acgcagaagc cacccaatct
481 atagtattaa cagtaatcct tgggtggttac ttcacacttc tacaagcaga agagtatata
541 gaagctccat tctctattgc agatagagtt tatggagcta ctttttctgt cgcactgga
601 ttccaggac tacatgtaat tattggetct ggttctctcc ttattgttt attccgaatg
661 cttattcacc acttttaac aaatcccat tttggtttg aagcagcagc atgatattga
721 cattttgtag atgtagtatg attaatctta tatacatgta ttattgatg aggatcttaa
781 catcacagt actataattt ttacttaaca ccgaatccat ttttaggaat ttatagctta
841 taaataaata ttatgtggtt atggttaaca ttttaattta tcttttaatt ttacttatta
901 ttaatgtagt ttattattg ttaggattaa ttattaataa acgatcatac tccgaccgag
961 aaaaaaatc tcctttgag tgtggtttg atccttcaat ccacacacga gctccctttt
1021 ctatacgatt ttccttctc gctgtgattt ttttaactt cgatgtggaa attattttac
1081 ttttacctt aacaagaaat attttaatt ctaacacceca ttgacctt accagtagta
1141 taattttctt aactattctc ttaattggcc tatttcatga atgaaacca ggatccttag
1201 actgaataaa ataatactat atctacctac ttaagtaaat taaacaaag ttttaagt
1261 aatcgaacac ttctaaaaag ctttcaaac ttttattac ccagtaaaaa cct**taataat**
1321 **ctaaaaata caatcatagc aagtctaaaa aggggctac taaaacacc ccaaccata**
1381 **taaccttaa gactfgccca ataaattcat aaggatactc tacaggacaa cctccaattc**
1441 **aagtaataa gaaaaaacat ccaatcatta atcaaaagtt taactgtata aatacattat**

1501 atctgcatcc acgacaacct tfaatatgta agaagggcaa aaaaaataat acacaaattg
 1561 atattactaa actaattaca ccccctaatt ttctaggaat tgaccgtaaa atagcataag
 1621 caaataagaa gtatcattca ggtttaatat gtaaaggggt tactaatgaa ttagctggaa
 1681 tgaattttc tgaatcacc aacgcatttg gaaatagtat actaaactca attaataata
 1741 afaatataac aaaaaacccc agtaaacttt tatatctata gtactgatga aatggaattt
 1801 tatctaagtt accattaatc cctaaagggg tattacttcc agtttgatgt aaaaaataaaa
 1861 aatgtataac cactattgcc ataagaacaa aaggtaacaa aaaatgaaaa caaaagaaac
 1921 gcctcaaagt agcattatct acagaaaacc ctctcaaat tcaatacaca accatctcac
 1981 ctacataagg aatagccgat accaaattag taattacagt agcaccceaa aaagatattt
 2041 gccctcaagg taaaagatag cctacaaaag ctgttctat tactaaaaac agtaaaacta
 2101 caccaatatt ccaagtctct attaatacat aagaaccata ataaatccca cgagcaacat
 2161 gaaaatataa acaataaaaa aaaaatgaag cccatttgc atgaatataa cgtaacactc
 2221 aaccataaft aacatcacgt ataatatgca ctacagaatc aaaagctatt tcaacacaag
 2281 aagtataatg tatagccaaa aacaatccac tgagaacttg cacaattaaa cataaaccca
 2341 ataaagaacc aaaattccac caaactgata aaftaacagg aactggtaaa tcaacgagag
 2401 ctccattaac aattttcaaa acaggatgac ttttactgaa tgaacttagc atataactatt
 2461 taaattttaa aaccgtaaa ggaccttcac aataatagca aattttfact accctaatta
 2521 aaacaaacaa taagataact gccataata cataacaaaa aaaattatcg tataatatga
 2581 taatgccctt acccccatt cttatataac cataatcaaa taaagatata cttttaacct
 2641 caactctcac taattctttt attacaaaa aattcattat tataaacca aaaaaaatga
 2701 aaaaaaata agcaaaaacc ttattagata aaaaaattaa gtttgggatt agtctaataa
 2761 catatataa tataaccaat atacctccta catatacaca aaaaagttaa taaccatacc
 2821 aagaaaaaat aaftaaccta gftaacctc ttacacataa aaccataagt attaataata
 2881 aacctaaact taaaggctga attactatta tacttaaact tcttagagaa aaccaacag
 2941 aatcataaa caacaagctc atatcaaaaa gtaagtaata ctcaacctta acttccaatg
 3001 ttaatttctt aaftaaacat ctttttgta cccattcaaa atataaaccc ttactaccaa
 3061 aaacattaaa attcttaata ctcttgtaa gtaactttc caaattagat atattagcaa
 3121 atcgtaacga taacgggggt acctggcacg aaccacaata aataatcacc caacaaaact

Región Cyt b


3181 cactataaca cataaaccta taccgaaaac tctacaaaa acaactccac caaaaaaaca
3241 actaataacc aataccctta taaaaagaat attaccgtat tctgccataa ataataaagc
3301 aaaacctaca ccaccatact cagtataaa cccagataca agttcagatt cccctctgc
3361 aaagtcaaac ggagcacgat gctctcagc aacacatgac acaaaccata ttaatattat
3421 aaaaaaattt acaaagcca ctcaacaaa aaactgatac ttataatta tactcaacct
3481 tatactgctt accaacaata aacaactcat caaaataaa gatatactaa ctccataaga
3541 aatacttga gctacagcac gaacagacc taatagggca tattagaat ttgaaaatca
3601 acctgcttct ataactat ataccaccag ccttgataca cacaaaaaca aaagtattct
3661 caaacccctt atttacaca caaaatagt attataaaga atccataaca ctaaagctaa
3721 aaataagctc atagccggac aaactaaaa cggaaaaaca ttaacaagag taggttaac
3781 cagctcttct gtaataaact taacggcatc cgctaaagg tttggaagcc ccattaacc
3841 aactttatta ggcccctac gtaattgaa ataacctaat cctttacgtt ccaataaggt
3901 aaagaaagca acagctaaga gggcacatac acacgaaac actccagaca ataattcaac
3961 aagcattatt aatacaatat attatttaag accatcttat atttcatat attaaccta
4021 cagattfaca aagaaaggct ttgaacctat tectcaagta tcaaaaactt acgttgacc
4081 tacaccacaa tgtaattatt accacgctta cgttattttt acaataaatg gtgtgtatat
4141 aatacagctt attaaattta cagagctta ttgacatat ctgaaatac cctattttta
4201 taccacctaa attcctgcg ccgtgtatat aattcactct agacatttat ctaggatata
4261 cccagaagtc tacagtagac tgaggttcat gattgatctt aactaagtc tacttatata
4321 accatccaca ctaccctct ataaaccata tcaattcatt aatataacca tccacactca
4381 cctccataa acaaaataaa taaatagata atacatacca ttttcttctt ttctaccctt
4441 tctcccate attcgttatt ttaaggeccc tctatatccc cttttattt tacaagtga
4501 taaaagcaat cactatataa tcccctaatt tccatataag ttaattttta ccaaaacct
4561 aaaaccttat ttatatcaat gaaaacaaca tatatatata tatatatata aactgcgcc
4621 ggatagaacg gattatattg atgttataaa ttataaggat ctcttctgt gtttaatat
4681 aattaaacaa attattatat ccttacgaat aaacttatt tattcacggt taataaaaaac
4741 tttagcttct tctgatcctt tctactaaa agaagcaata acaatcttta aaagatagaa
4801 accaacctgg ctacgccgg tctgaactca gatcatgtaa agtttaaaa atcgaacaga

4861 tttacctatt aaagctctg caccttaagg ttactttaat ccaacatcga ggctgcaatc
4921 ttatittca ataagaactc tctaaataaa ttacgtggtt atccctatgg taactatatt
4981 ataagcaata tacggttcta tacgtaatat cggttacttt atcaacaat atactctact
5041 aaggaagtta ctaactaata tactttatc cttaatcacc ccaattaaaa taatctaaa
5101 aaaataataa gaattaaata tagggtcttc tcgtcccttt aaagaattca agcttttca
5161 ctatgaaaa taatttctaa gaaataaaat agagacagat taacctctg caaaccttc
5221 attctagct caaattataa ggcaaattat tatgctacct tagtacagtt aaaataccgc
5281 agctgtaaa atttcaccg agcaggccca actccttata tataaattc aaagagagat
5341 gttttgata aacagcgag attactattt gccgaattcc ttttttat ttactata
5401 caaaacttat aactattac aattataacc accacaaca tataaatatg ttacttaat
5461 actcatatta acattatatt tagttactta cattaataac cattattaa ctctacctg
5521 aatacatata catacataaa actfaaata ttaagaaaa caatatcttt aacctactt
5581 aaattataat aaatattact actaaatatt ctacattctt atataaagct taccctcat
5641 acaataaact aatgtttaa tataaatatt tattacaca aactatagtt actfaaatac
5701 ttactactaa taaactagct atactgaaaa acgataaaca ttcattacc attcaataat
5761 caacatataa cttaccacg ttaacatata ttatcaata aatccttca atcgagata
5821 gctctataaa caactataa tatcatcaac ccattataca aaaggtacaa aatttatct
5881 ttactaaaa acaaatatac ttctatcctt tacagtactt aaacaaaaat ttatctatgc
5941 tattaatacc taaataataa acaatttta ttacattaaa atacaacact ttgtaactta
6001 attctttatc aaaactgact aatatataat catcttctca atgtaagtga gacacattta
6061 tttatgtaa gttctgtagt attattccag gaacagcttc cactaccctt actatgttac
6121 gacttatctt atctccaac aagagcgacg ggcgatatgt acgcattata aaaccaatt
6181 cacaaaacac actatttaa tattttata ctaccaagtc caactcata atttaattac
6241 ataaactaat cagattaaat attacaaact gtgctcact tttaaacct tttcataag
6301 ctgcattttg acttgacatc ataatecatc cattataaag tttttcaa aattttaca
6361 aaataaactg acgacagcaa tacacaaact gtaattatc aagaaaaagt aagtataat
6421 tgaggaatat caaattaata agcaagctcc cctggaagga tatataatac cgccaagcct
6481 ttaagtffc aagcacaatc taaattaat atcactaatt attatttagc tcttactact

6541 taaataataa aatftttaa ataaagaata atagggtctc taatcctagt ctactcaaat
6601 cttatttca aagaatttag aattaggata atataattaa ttataaaaat taaattttac
6661 ctacaattac tatactcatt taccctaate tcaftttaa atacattact ttattttata
6721 ctttttaa ataaattcaa agtattgga taaccgcaga tgcctgcacc aatttaacca
6781 cttttaa atactaacta tatcaactt tcatccattg tataaaaata aactgcctg
6841 agttcacta ttatatata atattatact atataacct ctgcttatt aagtattaa
6901 cttatacaa cagtaataa taaacaaacc gcttattct atactatta aacctgctg
6961 tataactaa taataacta tattataacc aaagccaaat taaaagtaa acgtaaaaca
7021 ttacgtcca caccacccc attgtttt actgcaagat taaacacac ttattataa
7081 aagacctga aagcctcag ttaactaa cttaaact tctgttaac cactataaac
7141 tattttaca ataatggtg tgtatata acacgttatt aaattacac gacttatta
7201 gacatatct gaaatacct attttatac ccctaaatt cccgtgcgc tgtatataa
7261 tcaactaaa cattatcta gcataacc agaagtctac agtagactga ggtcatgat
7321 gatcttac taagtact tatatacca tccactca ccctataa accatata
7381 ttattaata taacctca cactacct ccaatacaa aataataa tacataatac
7441 ataccatgt ccttctct acccttct ccatcattc gttattaa ggcctctc
7501 taccctct ttatttaca atgtataa agcaactact atataatcc ctatttca
7561 tataagtaa ttttaacca aaccataaa cctattat ataatgaaa acaacata
7621 tatatatata ttaagtgcc gaatgagta gcactagact ttaactag ataatggtg
7681 tattaatcc ttaataata ttataaggt aattaggaat aaaataaagc tgcacttt
7741 atttgagca actcaaaact gttctact ttatgacaa taaattct ccatctaat
7801 tttattat tacaatata ttaataggca cattattct ttatctcc tccattgat
7861 taactatgt aataggccta gaattaaatc ttataggatt ttaccctt ataatatta
7921 aaggtaaat atagaagct gaggtcca taaatact tattatcaa agaataagat
7981 ctagggttt aatcttca tctattata tatattca caactgtcc tgatacca
8041 tattacaaa tctaccatt acagcttca ttataatc ttaattata aaattggggg
8101 ggcgcctct tcttttga ctccaagta ttactaaca aatcttga agaactct
8161 tctaatftt aacatgaca aaagtgac cctattat ataatctt ctaaacata

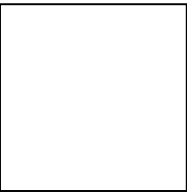
8221 actacaactc actcattatt ttatcaattt tatccactat agtaggtagt gtcagggccc
8281 tcaatcaaaa ccaatatcaa ctaattataa catactcadc aatctcacac ctagggtgaa
8341 taatatctat aattttagtg aataatgtat taactataac ctattttatt atctacgta
8401 ttatctcgtt accttaata aatttactta gctctaattt aggtaataca ttatttatac
8461 taactcaaaa aaacaaatct aataatataa ttactatttc actgatttta tctttagggg
8521 gctctccacc tcttttaggt ttatatcta aattaaccgt tcttattca ttgattgaaa
8581 taaaaataat tataataaca ttaactactac ttaccggaac acttattaga ctatattct
8641 atcttaatat agctctaata ttaataatca aatcttacca aataattgaa aaccctaact
8701 ctaataaacc ttataaccct ataattatat taaactgatt tagtagattt attgtttacc
8761 caataatcac cataatcatg atatatgca tgactatttt ccacaaatca taaagattt
8821 ggaacattat attttatctt tggaatttga gcagggtag ttggtacctc attaagatta
8881 ataaccgaa cagaactagg aaaaccggg acactcttaa atgatgacca actatacaat
8941 gtagtagtaa ctgctcacgg tttattata attttttta tagttatacc aatcataatt
9001 ggaggatttg gaaactggtt agtaccttta atattagggtg cccagatat agccttcct
9061 cgaatgaata atataagatt ctgactactc cccccctct taactattt acttgctca
9121 tctgccgtag aaagagggggc aggtacagga tgaacagtgt acccccctct atctagaaac
9181 ctttcacatg caggcccttc cgtcgactta gctatttttt ctcttcattt ggcaggtatt
9241 tctccattt taggggcaat taattttatt acaactatta taaatatacg atgagaaggt
9301 ttattaatag aacgattatc tttatcgtc tgatcgggat ttattaccgc aattttact
9361 tctettatca ttaccgctc tagcaggggc tattacaata ctctcaccg atcgaaattt
9421 aataaccactt tctttgacce tagtgggtgga ggggacccta ttctttacca acatctttt
9481 tgatttttg ggcaccaga agtgatattt ctaatccttc ctgcatttgg tattatttca
9541 catattgtat ctatcactc ttttaaaaa gagatttttg gtactttagg tataatttat
9601 gccatactct ctattggttt actaggtttt attgtgtgag cacatcacat atttactgtt
9661 ggtatagatg tagacaccg tgcctacttc acatccgcca caataattat tgctatccct
9721 actggaatca aagtatttag atggttagct acaatttatg gatcaccagt taaatacaac
9781 acccctatac tatgagcact aggatttatt ttttgttta cagtgggtgg ttaacaggt
9841 attattttat caaactcctc tctagatatt atactacatg atacttatta tgtagtagcc

9901 catttccatt atgttttacc aataggtgct gtatttgcac tatttctgg ctcaatcac
9961 tgataccat taattacagg acttaccctt aatcaacaat ggacaaaaac acatttcag
10021 gccatattct taggagtaa cactacttcc ttctctcaac attttttagg ttagctggt
10081 atacctcgac gatactcaga ctatcctgat tgttatacta aatgaaatat agtaccctct
10141 ataggatcta tactatccct agtaagagtc ttattttta tttttattgt atgagaaaga
10201 ttaatttctc aacgaacagt aatttgatct aatcaccttt ctccatcttt agaatgagat
10261 aaccgattac ccgtagattt ccatagccta tctgaaactg gagcaatcta cgtttaatag
10321 ctattatatt attaataata aataaaaaata aaaattatca taaataagtt tcaatatac
10381 attacatctt taggtttgca acctaagtgt tttattaac tatgaaacca tgagaaagtc
10441 ctacaactta tcatagattt tacaatctac cgactttaat cgaccacctc atatttacac
10501 tatattctta acactaataa cttaaatagt gctctaaaag attgaaaatc taatgtgctc
10561 atacaccata agaacctacc aataaacaata atactattta caaatttatt aatatactc
10621 ttaattaat attcactcaa tagtataaat tatacctcat actaacttta ataaaaataa
10681 aatataata tatataata tatataata cagtgaaaag ccaaataagag gcatttaact
10741 gtaataataa aaattgtaat actattactt cgctggcttt aatttatgac ctactgagga
10801 caattagatg tcaagatgc ttgtccacca cttatagaac aaattatctt tttcatgat
10861 cacgccatatt ttgctattct tatagtactc accatagtta tatataatac ttatattcta
10921 ataaccaata aattctcatg ttttaataat agtgaaagac aaaaaattga gactatttga
10981 acagtagccc ctgcaattat ttacttttc ttactctcc cctcattacg attattatac
11041 ttattagatg agaccaacaa ccctctctt actatcaaaa ccataggaca tcaatgatat
11101 tgaagctatg aatattcaga ctctctagat attgaatttg atgcataat aattcctaca
11161 aatgaattaa accttgagga ctaccgacta ctgaaactg accaccattt aattttacct
11221 ataaaaacaa atactcgaat tattgttca tggctgagg taatccactc ttgagcagtc
11281 cctatactag gagtaaaagt tgacgccatc ccgggacgac taaaccaatt aatattatat
11341 cctaactgcc caggccttta ctatgtcaa tgtccgaaa tttgtggagc taaccactct
11401 tttacacta ttacctaga agttgtaaat ataacctact tcattaagtg attatagct
11461 ataaatgaag agaactaata agcaattata gataatataa attaatgtag cataattaat
11521 aataaaggaa cttattcat tttggggta tgaaccaac agctattttt ttacttact

11581 ttattctatt atatgtat actttcaat tatatcacia ctcaacaaa gaaatgatta
11641 atcatatag attcggctc atacattagg tgtacaaaca ccctgttta atatattaa
11701 agatataata atcacctga cacctcaac gtcacgtct ctftaagcta ttcaactaa
11761 actaataat aaaaatcatt attacaaaa taattatata acagttaaat attagcatta
11821 accaatgtc caatattaa aacacaatct tattatgft aaatacact tgacctcaa
11881 aaatcmeta ccaacctata tctaccact ttaatctact attagtaaca ctftaaatc
11941 tcccaatgc tggaaaacat aaaaaactgg ataaaaata cattcttcta ttaatatag
12001 ttaataacc aatattaatt ttaacgtcc ccttatcca aaaacmeta gaaatatta
12061 atctataat gattaatag ggtaccataa gttttattat tmetaataa metaaccta
12121 aattaaaca agggaacaat tcttmeta metaaccacc aaacaagct cccatacca
12181 acattgatat cggmetaact atttcaat cattatcatt aatattata taactacag
12241 aagttcatt gtctmeta atmetaaag metaacgtat agaataaga acagttaac
12301 aaacmeta cgcacmeta ataatatta ctaatttat attcctaca attaaagatt
12361 caataata atcttagaa metaaccag ccaagaagg tataccat aaagccat
12421 tmetaatgt metaaagta ctagtacag gcaataatt agatacta tcaattgac
12481 gtatctctg ttaccteta taacaatgaa taatattacc cccacata metaaag
12541 ccttaatat agcatgtgta tataaatgaa metaagcmeta tatagttatt cmetaacca
12601 aagatattat tataacact aactgcmeta gggtagata agcaataatc ttcttatgt
12661 catacteta metaacmeta acaccagata taatctgtg cataataga atmetaata
12721 metaaatt metaacata taacaatta metaataa metaaata metaaaaa
12781 cccagcagat aactaaagta gatgaatgaa metaagctga gactggtgta ggtgcagta
12841 tagctgcagg taatcteta metaaaggaa tctgactct ttattata ccagcatta
12901 metaaaca atttaccmeta metaagccac metaactceta metaaagc acattcaat
12961 gmetaaac aattattata gccaccgccc metaataa metaacmeta actcgatta
13021 ttaatacag aagtattca gcagcagg acttactatt ttmetaata attacaagc
13081 metaagagc metaactaac cgtctcacc metaataa metaactagc ctaggata
13141 metaaaaa atttatagc metaaaca atataacag metaaaca cgmetaaat
13201 taacatccc ccttatata ctcatgta ataccata acagccagaa metaacata

13261 ctaatccct aaatctacaa cttattcaat caattaccaa atcaaacca atctctctcc
13321 ttatacaatt tataattct cacctaaata ataaacaaat attattfaca cataaataaa
13381 ctaataaaaa aaatataaaa aaaaaccaac taaatattat aaccctaaaa cacaactcaa
13441 ttccaattaa tttaaacatt ataaagtatt aaattatata accaaatgac aattcagtac
13501 ctacttact aggttaactc tatatttaa aataaaaaaa tcttattaa ataaccaca
13561 tttaaaaata aaaatagat aggaaaaaaa tgaagtaata ataacaata ctcctacaa
13621 acattaacag accatctatt agtaaacctt ataactctc catgttgtgt acttacaat
13681 ataaccaa tgtataacc tctataaac accatcaata aaataataat aataaatcat
13741 ctactatata tatatataca aaaaaacaat attacctcac taataagtcc aacaaaagg
13801 ggggcgccta tattcccaat acaaaataaa aatcatcata aacatataat aggccttaca
13861 ttaattatac ctccacacaa aaataatcta cgacttttaa acttctcata tattaaata
13921 gctaaacaaa ataacctga agaacaaaaa ccatgtgaaa ttattattaa tatagctct
13981 tctcatctc acataaactt ccttattaca cctcctaata tcaaacctat atgaccaca
14041 gaagaatag caaftaaaga cttaatatcc ctctgaccaa cacaataac ggcagtaac
14101 accccacccc acacacaaat aattataaac actttactaa acaataaatt atttaaaaa
14161 taaacctca ataaacgtaa aatcccataa ccacctaatt ttaataacac cctgcaaaa
14221 attattgagc ctgcaatagg ggctccaca tagactttag gcaaccataa atgtactgaa
14281 aatataggtta acttaaccaa aaaagcgct attaaaccta aaaaccataa tcccccaaca
14341 ttatatata aatctaagca atttaaatat gttactaaca ttatattaa agaattatat
14401 ataccctca ccataactaa gctaagtaat aaaggaagag atgcagaaat agtatataat
14461 atcatataaa caccagcctg taaacgctg ggctgataac ctcaaccaat aattaatc
14521 aaagtaggaa tcaagaat ttcaaaaaa atataaaaat atataacatg aatacacaaa
14581 aaatataaaa taactactat agccaacata attacaacat acacaataa taaacttta
14641 ttattatta ccttaaccga ataattacta gccaaaaaca taaggccctt aatccataaa
14701 gttaaaacta ccaatatccc acttactca tcataataaa aaaatcatt tattacatta
14761 cccagactt ctacattcaa aaactcaca cataaaagac ataacctat taatcatcaa
14821 aaagatgctt cccatgctat aactccccgt agaaaaaaca acccacacat tctaaataac
14881 aatcctataa tttatataaa ctcaatgaac taacgtagtc attaccatga acacgaataa

14941 gtctcaccaa caaagacaac cctaaactcg cttcacacac cccaaatact acaataacca
15001 ttataact ataactccc ctatataacc ctcaagttaa taaaaaggaa aaaataatc
15061 ccaacattat aattcaaaa ctcaacaaaa tatttagaat atgtttccat tgaaatatta
15121 aaacaaaaac cctcttata taataaata tacctaata caactctct cttataatca
15181 tgccttaata ttagtgtaa tagttaaca aaaactgg tcttgtaac cagaattaga
15241 tcatgtttt ataactctac ccaaaccca aatattaaga agaattatta atattctta
15301 atagaagctt aattctatg cactgatctg ccatctta atatttaaat attttatta
15361 aatacttaa acctttgtt tggaacaaa atatactatt tatactaata aatattatt
15421 accacgctta cgttatttt acaataaatg gtgtgtat aatacaggt attaaatta
15481 cagagctta tttagacat ctcgaaatc cctatttta tacccectaa atcctctcg
15541 ccgtgtat aattactct aaacattat cttagatata cccagaagtc tacagtagac
15601 tgaggttcat gatgatctta cactaagct acttatata ccatccacac teaccctca
15661 taaaccat caattcatta atataacct ccacactcac cctccataa ccaataaat
15721 aaatagata tacatccat gttccttct tctaccctt ctccccatca ttcttatt
15781 taaggccct ctatcccc cttttttt acaaatgat aaaagcaatc actatataat
15841 ccctaatt ccatataagt taatttaac caaaccata aaaccttatt tatatcaatg
15901 aaaaaacat tacctctata aagggtatta factttat taagaagata tgattgcaa
15961 tcataaagaa agactcatct ttaataccat ctactctaa taaaagtt gttaaattat
16021 aacataaat tgcaatttt atattactat accatagatc ttttcatg ccacaattat
16081 cccccataa ttgattatt ttattacta tttttgatc cattatatt attaacat
16141 ctattatg atgaaataat actaatcct actccatcaa taaatcatta aaaacaaca
16201 taaatgtaa ttataatga tagtatgata gtagacatct ttcttcatt tgatgatcat
16261 aactcaacc tttttctat acacataata acttgattat taccctatg gtctctattc
16321 ttattaatt ctctactg aattaattca tctaataat caacattat agctttacc
16381 aaacaagct tfaatcca aactacgct tcatatagga taaacttgg aggatttagt
16441 ttactgtat ctctctatt cttactatt attaattta atagttagg acttatact
16501 tatgtatta gtactagat ccacctgct ataacttta gcttatctt accgctatga
16561 ttctctta ttactctt ttatataat aatcctact caagactgc ttcatatta



16621 cctataggta cccattcct tatccattc ctcctatta tgaatcatt aagtattta
16681 gttcgaccta tcacctate aatccgacta gctgccaaca ttagtgcagg tcacattatt
16741 ctaacctaa ttggagacta ccttataatt tctatattgt ctaacgccta cgctgtgca
16801 ttaattgtaa tattaatcca aattggttat ttatcttcg agattggaat tggaattatt
16861 caagatata tttctctct tctaattacc ctatatactg atgaccatca atagtacact
16921 ataatagcct cataatataa taaatatcca tcactagtaa agtaaacctg atttatctac
16981 aaatccacaa ttgtcattt tacttaaact aacttcaact atacaaagta agactacaca
17041 ctagtcttat aaaataatcc taaattatc acataattct gccaaacttg cccaactaca
17101 tatacatcta taaattaca aaccataca taataatata ctatacaaaa taataatatt
17161 agtgctttta aattactaat aataatgaaa tatatatata tatatatata t