UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

PROPUESTA PARA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO EN CARNE DE CERDO POR MEDIO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA

GARZA PORRAS MARÍA CIPACTLI

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2014

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

VNIVERSIDAD NACIONAL AVTONOMA DE MEXICO

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Propuesta para identificación molecular del género en carne de cerdo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa

Que presenta la pasante: **María Cipactli Garza Porras**
Con número de cuenta: **406008611** 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 ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Abril de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
SECRETARIO	I.A. Miriam Álvarez Velasco	
1er. SUPLENTE	Dr. Enrique Martínez Manrique	
2do. SUPLENTE	Dr. Omar Reyes Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mis padres, Adán y Carolina, porque creyeron en mi y porque me impulsaron hacia adelante, brindándome su apoyo en todo momento, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron estimulado el coraje para seguir en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, porque los admiro por su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A Javier, mi compañero de vida, gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecer tu apoyo, tu comprensión y tus consejos en los momentos difíciles.

A mi hermano Noé, por haberme sacado de esas pequeñas, pero importantes dudas y por mostrarme que los problemas no son tan difíciles como parecen, por nunca decirme que no a mis constantes pequeños favores.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, porque en sus aulas, recibí el conocimiento intelectual y humano de cada uno de sus docentes.

Especial agradecimiento a mi asesor de tesis, Dr. José Francisco Montiel Sosa por haberme dado la oportunidad y por el apoyo ofrecido para la realización de ésta tesis.

INTRODUCCIÓN **6**
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES **8**
1.1 Consumo de carne de cerdo en México 8
1.2 Producción de carne de cerdo en México 10
1.3 Reacción de los consumidores a la carne de cerdo de machos enteros 12
1.4 El cerdo 15
1.4.1 Morfología y fisiología del cerdo 16
1.4.2 La androstenona y el escatol 17
1.4.3 Técnicas de castración 20
1.4.4 Normas para el sacrificio 26
CAPÍTULO II. PCR **29**
2.1 Autentificación de especies y técnicas 29
2.2 Extracción de DNA 32
2.2.3 Etapas en la extracción de ADN 33
2.3 Cuantificación de DNA 34
2.4 Diseño de primers 35
2.5 La técnica de PCR 37
2.5.1 Fundamento y antecedentes 37
2.5.2 Zona de Amplificación 39
2.6 Preparación del gel de agarosa 44
2.7 Electroforesis 45
2.7.1 Fundamento 45
2.7.2 Tipos de electroforesis 46
CAPÍTULO III ESTRATEGIA METODOLÓGICA **49**
3.1 Justificación 49
3.2 Problema 49
3.3 Objetivo general 49
3.4 Objetivos particulares 49
3.4.1 Objetivo particular 1 49
3.4.2 Objetivo particular 2 50

3.4.3 Objetivo particular 3 50
3.4.4 Objetivo particular 4 51
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN 52
4.1 Resultados 52
4.1.1 Materiales y métodos 53
4.1.1.1 Muestra 53
4.1.1.2 Equipos 53
4.1.1.3 Materiales 54
4.1.1.4 Reactivos 54
4.1.2 Estrategia metodológica 54
4.1.2.1 Extracción de DNA total a partir de tejido muscular 54
4.1.2.2 Cuantificación de DNA por medición de absorbancia a 260 nm 55
4.1.2.3 Amplificación de DNA 56
4.1.2.4 Etapas y ciclos de la reacción 57
4.1.2.5 Preparación del gel de agarosa 57
4.1.2.6 Electroforesis horizontal 58
4.1.2.7 Fotodocumentador 59
4.2 Discusión 60
CONCLUSIONES 62
Referencias 63

INTRODUCCIÓN

El consumo de carne de cerdo en México actualmente compite con la carne de res y de pollo que son sus más cercanas competidoras (Comecarne, 2011).

La mayor parte de los cerdos machos para consumo que se sacrifican son castrados. El motivo principal es evitar el “olor sexual”. Normalmente la carne de cerdo macho produce un olor desagradable debido a la segregación de dos hormonas que son el escatol y la androstenona. Este olor se conoce como olor a verraco. Esto se manifiesta en un olor y sabor desagradable que no se inhibe con la cocción de la carne (Mathur *et al*., 2012).

Este olor se puede evitar mediante la castración del cerdo en los primeros siete días de edad. La castración se puede realizar con o sin anestesia y se debe llevar a cabo por medio de un veterinario. Pero la aplicación de la anestesia y la contratación de personal especializado para realizar este tipo de operación hacen que la relación costo-beneficio se vea reducida, por lo cual se procede a realizar la operación sin ningún tipo de anestesia y/o analgésico y la realización de la operación se delega al mismo personal encargado del ganado. Esto supone un gran sufrimiento al animal, lo que ha llevado a organizaciones en contra del maltrato animal, en distintos países de la Unión Europea, a exigir carne de cerdo proveniente sólo de hembras para que se haga conciencia sobre el método de castración utilizado, y poder cambiar o acabar con ese tipo de tortura (Abdulmawjood *et al*., 2012).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido uno de los avances más útiles que se han suscitado en los últimos años dentro del campo de la biología molecular. La amplificación exponencial de mínimas cantidades de material genético hacen de ésta técnica una herramienta sumamente útil para diagnóstico de enfermedades infecciosas y parasitarias, clonación de genes, autenticación de especies y muchas otras técnicas de análisis de ADN y ARN (Zavala, 2005).

Actualmente existen otras técnicas que pueden utilizar los productores en sus esfuerzos por producir carne de cerdo de alta calidad sin olor a verraco. La vacunación es una solución viable y disponible para controlar el olor a verraco de los cerdos macho. Para lograrlo, las empresas que adquieren carne de cerdo a proveedores locales y/o empresas dedicadas a la producción de la carne, necesitan un método rápido y eficaz que les

permita detectar que la carne que les están entregando sea efectivamente de hembras, todo esto con la finalidad de ayudar con la causa y/o cumplir con las demandas que el cliente requiere. Toda esta labor ha sido realizada en países de la Unión Europea y en este proyecto se pretende informar sobre la situación de los cerdos en México, los métodos de castración utilizados y crear una técnica que permita la detección de carne de cerdo hembra o macho, en carne cruda y productos derivados (Díaz y Mejía, 2007).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 Consumo de carne de cerdo en México

Actualmente en México el consumo de carne de cerdo es elemental en la dieta. La población mexicana consume anualmente veintidós millones de cerdos, de los cuales, ocho se adquieren en el extranjero, principalmente en el mercado estadounidense. En la década de los ochenta el consumo de cerdo por persona en México era de veintidós kilogramos, años después esta cifra descendió a nueve kilogramos y actualmente se ha recuperado hasta llegar a catorce. Sin embargo, el consumo de la carne de pollo ocupa el primer lugar, seguido de la carne de res y en tercer puesto la carne de puerco. El comprador más importante de la carne de cerdo en México es la industria procesadora (fabricantes de salchichas, jamón, carnes enlatadas, chorizo, etc). En tanto que, el mayor consumo per cápita de carne de cerdo se presenta en estas carnes procesadas. La carne de cerdo que presenta el característico olor a “verraco” se puede utilizar en la industria de embutidos, ya que debido a los aditivos que se le incorporan a la carne, ésta no le confiere características desagradables al producto (Díaz y Mejía, 2007).

Aunque es más conocido el cerdo por sí mismo que sus productos cárnicos, se ha establecido que el procesamiento hace, a la carne afectada por el olor a verraco, más aceptable, especialmente si se añaden especias o aromas que ayuden a ocultar el defecto. Varios estudios han demostrado que el olor a verraco no tiene efecto negativo en la calidad de productos sometidos a cocción, como el jamón, si éstos se consumen en frío. La cocción reduce el contenido de androstenona y escatol, aunque muy poco se sabe cómo es que éstos componentes son degradados durante el proceso de elaboración (Costa *et al*., 2013).

En el país existen aproximadamente 1,000 procesadores de carne; sin embargo, un grupo pequeño de empresas representa más de 50% del volumen total. Así, Sigma Alimentos produce cerca de 27% de todas las carnes procesadas en México. Zwan, Parma, Alpino y otros representan otro 25% del mercado, estas compañías demandan cada año grandes cantidades de carne de cerdo. Otros grandes compradores de carne de cerdo en México son los supermercados, para ellos no es difícil mantener una oferta local mínima porque este tipo de carne es sólo uno de los miles de artículos que venden en sus tiendas, lo

compran a los precios más baratos que puedan encontrar. En años recientes han encontrado los precios más bajos para carne de cerdo en los EUA. El tercer mercado en México se compone del sector institucional, las carnicerías y mercados públicos, estos últimos son suministrados principalmente por los productores locales (Díaz y Mejía, 2007).

Un problema que se desea evitar al adquirir carne de cerdo es que posea olores desagradables y que no tenga las características organolépticas adecuadas según lo que la normatividad requiere. El principal problema en la carne de cerdo es el indeseable olor que producen los cerdos machos al entrar en la etapa de vida reproductiva, ya que segregan principalmente dos hormonas: el escatol y la androstenona. Estas hormonas actúan afectando el olor y el sabor de la carne. Este problema se puede evitar mediante la castración del cerdo en la etapa temprana de su vida (siete días). Pero como la castración se realiza sin ningún tipo de anestésicos, existe el sufrimiento del animal durante ésta operación, creando controversia con las asociaciones protectoras de animales. El procedimiento se realiza sin anestesia (en la gran mayoría de los casos), ya que al utilizarla, y aunado a la contratación de personal especializado que realice la cirugía, se elevan los costos de producción. Debido a esto la castración se ha convertido en un problema tanto para el animal que sufre por la castración sin anestésicos, como para el consumidor, que está creando conciencia en lo concerniente a la castración de los cerdos sin la utilización de anestesia. (Langen *et al*., 2010)

Por otro lado la presencia del olor indeseable no es tolerada por los consumidores. Hoy en día no existen métodos para la detección del mal olor ya que es una propiedad que se mide subjetivamente, ni tampoco una manera de detectar la diferenciación de género de una forma rápida (Mathur *et al*., 2012).

1.2 Producción de carne de cerdo en México

Se prevé que el sacrificio total aumente de 15.9 millones de cabezas en 2011 a 19 millones en 2020 (Figura 1). Considerando el peso promedio nacional de sacrificio, la producción nacional de carne de cerdo se incrementaría de 1.17 millones de toneladas en 2011 a 1.42 millones de toneladas en 2020 (Figura 2). En el corto y mediano plazo, la producción de carne de cerdo crecerá más rápido que en largo plazo (Figura 3) (SAGARPA, 2011).

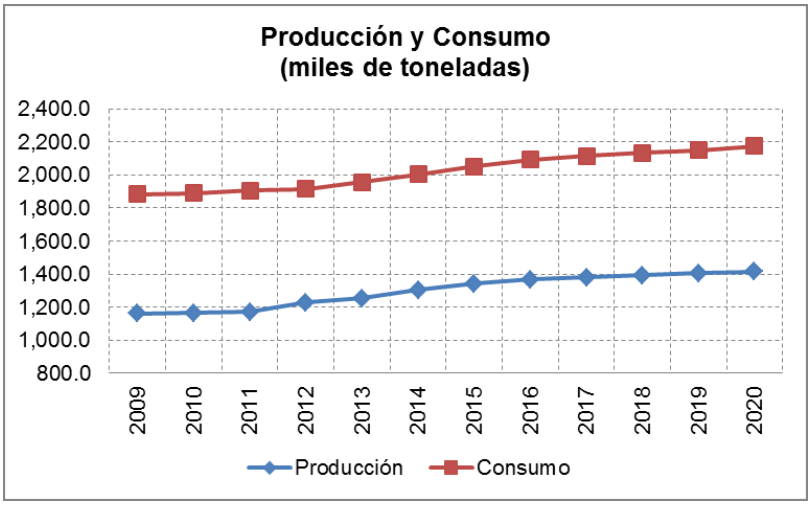
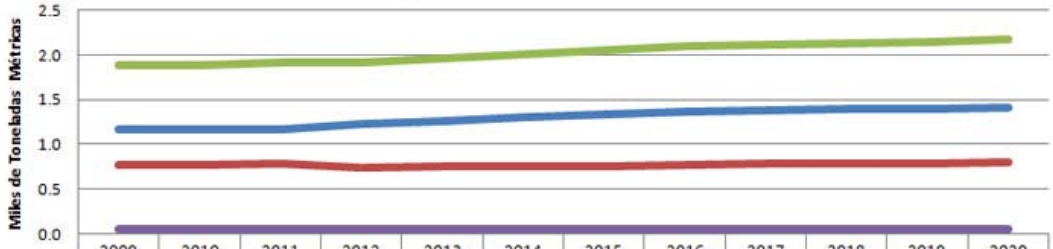


Figura 1 Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011- 2020 (Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios) (SAGARPA, 2011).

Tabla 1 Producción y consumo de carne de cerdo en México (SAGARPA, 2011).

Año calendario	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Carne de cerdo			(miles de toneladas métricas)									
Producción	1,162.9	1,165.5	1,170.7	1,228.9	1,255.0	1,304.7	1,343.5	1,367.5	1,381.3	1,392.6	1,404.3	1,416.2
Importaciones	771.7	784.3	796.2	746.1	757.3	757.4	765.5	780.2	788.0	794.8	797.5	810.2
Oferta	1,934.7	1,949.7	1,966.9	1,974.9	2,012.3	2,062.1	2,109.0	2,147.7	2,169.3	2,187.4	2,201.8	2,226.4
Consumo	1,882.5	1,888.7	1,907.0	1,916.9	1,955.4	2,005.2	2,053.0	2,093.1	2,115.5	2,134.3	2,148.9	2,174.8
Exportaciones	52	61	60	58	57	57	56	55	54	53	53	52

SFA-SAGARPA *Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011- 2020*



	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Producción	1,162.9	1,165.5	1,170.7	1,228.9	1,255.0	1,304.7	1,343.5	1,367.5	1,381.3	1,392.6	1,404.3	1,416.2
Importaciones	771.7	784.3	796.2	746.1	757.3	757.4	765.5	780.2	788.0	794.8	797.5	810.2
Consumo doméstico	1,882.5	1,888.7	1,907.0	1,916.9	1,955.4	2,005.2	2,053.0	2,093.1	2,115.5	2,134.3	2,148.9	2,174.8
Exportaciones	52	61	60	58	57	57	56	55	54	53	53	52

Figura 2 Proyección de la producción y Consumo de Carne de Cerdo en México (SAGARPA, 2011).

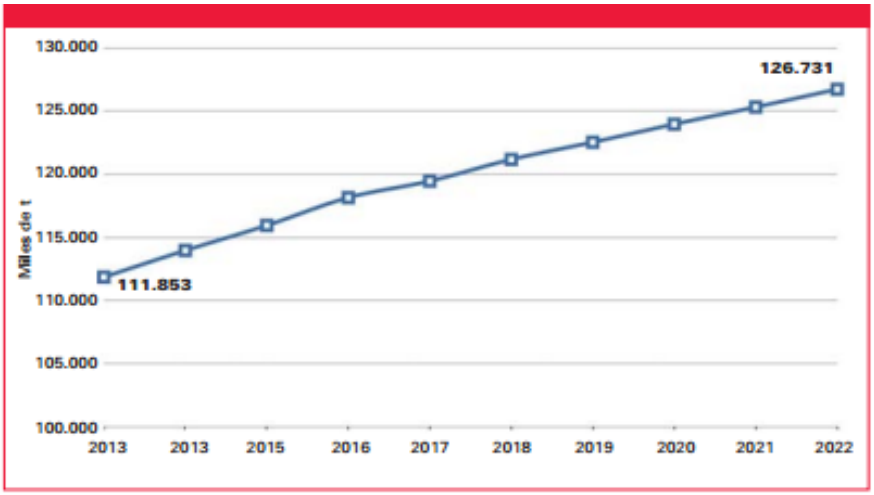


Figura 3 Previsión de la evolución de la producción de carne de cerdo a nivel mundial (FAO-OCDE, 2013).

De acuerdo con datos de los informes de previsiones elaborados por la FAO y la OCDE, durante 2013 se llegarán a producir a nivel mundial en torno a 301.5 millones de

toneladas de carne (sumando, vacuno, porcino, aves y ovino). De este total, la de cerdo es la mayoritaria con el 36.3% del total (103.83 millones de toneladas), seguida en importancia por la de aves con el 34.2%.Cabe destacar que las predicciones hechas por estos organismos apuntan a que en 2022 la producción cárnica mundial alcance los 347.7 millones de toneladas y la de cerdo seguirá siendo en torno al 36.4% de dicha cantidad (126.7 millones de toneladas aproximadamente) (Figura 4) (FAO-OCDE, 2013).

De acuerdo con los resultados de los indicadores de los tres países integrantes del TLCAN, México presentó un posicionamiento internacional menos favorable lo que significa una menor competitividad. Por otra parte cabe destacar, que independientemente de que éstos indicadores sólo se refieren al grado de apertura y a la participación del país a nivel internacional, medido a través de flujos comerciales de la carne de cerdo, refleja lo que está ocurriendo con la estructura productiva de la porcicultura nacional ante el avance de la integración y la globalización económica mundial (Martínez *et al*., 2008).

1.3 Reacción de los consumidores a la carne de cerdo de machos enteros

Hay diferencias sustanciales entre los panelistas y especialmente en la aproximación de éstos al evaluar el olor sexual. Al pasar de los años, se ha reunido evidencia que la androstenona y el escatol son los principales componentes responsables del olor sexual, así muchos estudios se han enfocado al estudio de los sistemas de evaluación sensorial para la detección del olor relacionado específicamente a los dos componentes que causan el olor (Mathur *et al*., 2012).

De cualquier manera, el rol sensorial jugado por el olor a verraco en productos como el jamón, es prácticamente desconocido, ya que no existen estudios específicos de los aspectos como la intensidad con que es percibida, su contribución al aroma y el sabor o su relación con otros atributos sensoriales (Costa *et al*., 2003).

El escatol y el indol son componentes que pueden derivar en un olor fecal indeseable en el tejido adiposo. Este olor es más pronunciado para el escatol que para el indol. Por lo mismo usualmente se refiere al escatol como la sustancia clave. En contraste a la androstenona, donde la sensibilidad del individuo es extremadamente variable y cerca del 25% de los consumidores no son capaces de oler la sustancia, el escatol es uniformemente detectado por todas las personas (Claus *et al*., 1994)

Es un hecho conocido que si se usan machos enteros en lugar de castrados, en carne de cerdo, los costos de producción disminuyen y aumenta la proporción de magro de la canal. El principal argumento que justifica la castración es el olor desagradable que se detecta en la grasa de machos enteros. Las pruebas organolépticas con paneles, muestran que el olor sexual tiene lugar solamente en una proporción limitada de canales de machos enteros y varias cualidades son muy similares para machos enteros y machos castrados. Generalmente las mujeres son más sensibles al olor que los hombres, aunque se han notado amplias variaciones entre sexos (Arnau, 2008).

Por razones de bienestar animal, la castración de los lechones machos ha causado polémica. Se evita eficazmente la aparición del llamado "olor a verraco", que se propone es causada principalmente por el esteroide testicular androstenona (5a-androst-3en-16ona), escatol (3-metilindol) e indol. Diferentes umbrales sensoriales de rechazo de la androstenona (500 a 1000 ng / g de grasa) y escatol (200 a 250 ng / g de grasa) se han utilizado para estimar el porcentaje de inaceptabilidad en las canales contaminados. Para la androstenona, hasta mayo de 2010 había rango legal en Alemania de 500 ng / g de grasa por debajo de los cuales las canales serían aceptables. Para el escatol, los umbrales de aceptación se sugirieron a ser considerablemente menores. Estudios muy recientes han demostrado que el umbral de escatol debe ser tan bajo como 150 ng / g en comparación con las sugerencias anteriores. También se demostró que la abundancia de escatol es un factor limitante para la aceptación de la carne de cerdo: En ausencia de escatol, la androstenona hasta a 2000 a 3000 ng / g de grasa no afectó la aceptación de los consumidores de chuletas de lomo con 5mm de grasa. Sin embargo, existen considerables diferencias entre laboratorios para la determinación de compuestos con mal olor, se han reportado las comparaciones de las diferentes dificultades de los estudios sensoriales. La modulación de métodos de análisis químicos es claramente necesario para derivar los rangos válidos de rechazo (Mörlein *et al*., 2012).

La trazabilidad es la respuesta a la demanda de los consumidores en relación a la transparencia y se está convirtiendo en sinónimo de seguridad y elevada calidad alimenticia. La trazabilidad se define como la capacidad para documentar todos los elementos relevantes (movimientos, procesos, controles) necesarios para la historia de un producto pudiendo ser utilizada para certificar la calidad de un alimento, su origen y también su seguridad en relación a estándares conocidos. Entonces, la trazabilidad se

convierte en la herramienta principal, tanto para asegurar la responsabilidad efectiva de los industriales y operarios de los alimentos, en relación a la calidad final del producto, como para acometer y manejar los riesgos de forma efectiva (Aguilar *et al.,* 2012).

Debido a la gran variación en la incidencia del olor a verraco, y debido también a la variedad de los hábitos culinarios entre países, la aceptabilidad del olor a verraco en la carne, como se midió en recientes estudios, pueden ser inconsistentes (Bonneau y Lebret, 2010).

En un estudio internacional usando una evaluación sensorial por panelistas entrenados en siete países Europeos, el objetivo fue principalmente la evaluación de las contribuciones relativas de la androstenona y el escatol en el olor sexual y posiblemente alcanzar un acuerdo internacional. Muestras de carne con niveles conocidos de androstenona y escatol fueron evaluados. Se elaboró un sistema de puntaje que empleaba diferentes atributos de olor como “olor a cerdo”, “olor a orina”, “olor a estiércol”, etc., en lugar de una escala progresiva gradual relacionada a la intensidad de olor sexual, como se maneja normalmente al evaluar los atributos de olor en la carne de cerdo. Al realizar la evaluación, se concluyó que era difícil homogenizar la metodología usada por siete paneles sensoriales a través de la Unión Europea. Los paneles sensoriales en general fueron capaces de diferenciar entre los dos componentes y entre los diferentes niveles de los componentes, pero hubo diferencias sustanciales entre los paneles de los diferentes países en el entendimiento del sistema de puntaje. De esta manera, no es posible explicar la intensidad de olor sexual totalmente usando los niveles de los dos componentes. (Mathur *et al*., 2012).

1.4 El cerdo

El cerdo doméstico adulto tiene un cuerpo pesado y redondeado, hocico comparativamente largo y flexible, patas cortas con pezuñas (cuatro dedos) y una cola corta. La piel, gruesa pero sensible, está cubierta en parte de ásperas cerdas y exhibe una amplia variedad de colores y dibujos. A pesar de su apariencia son animales ágiles, rápidos e inteligentes. Adaptados para la producción de carne, dado que crecen y maduran con rapidez, tienen un período de gestación corto, de unos 114 días, y pueden tener un buen número de lechones por camada. Son los únicos mamíferos que carecen de glándulas sudoríparas y por ello necesitan enlodarse con frecuencia para mantenerse frescos en climas cálidos.

Poseen algunas características que les han resultado positivas para su supervivencia.

- La capa y los pelos oscuros proporcionan resistencia a la insolación.
- El hocico alargado y la fortaleza de las extremidades resultan muy adecuados para superar las duras condiciones de crianza.
- Un metabolismo basal reducido y la precoz formación de tejidos grasos son factores esenciales para contrarrestar las situaciones posibles de escasez alimenticia.

(Bello, 2008)

1.4.1 Morfología y fisiología del cerdo

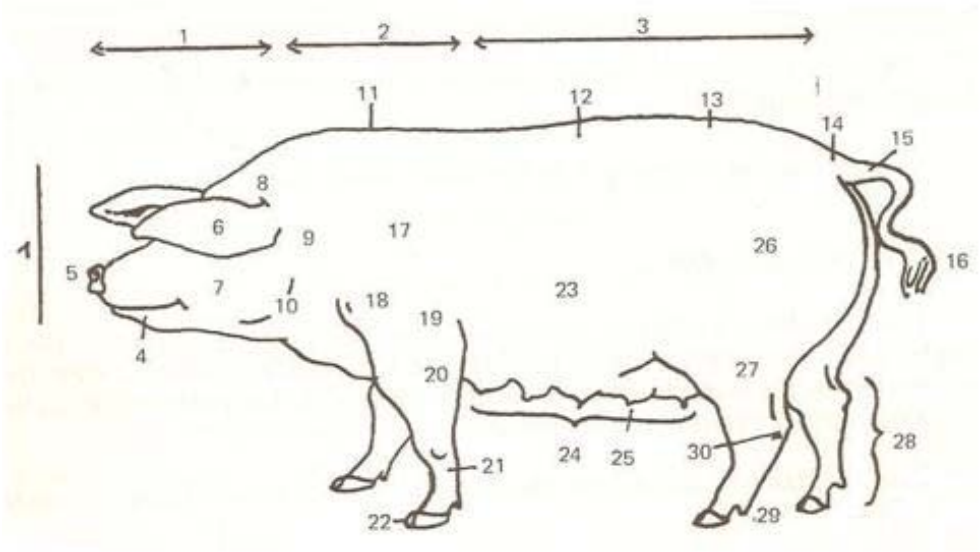


Figura 4 Morfología del cerdo (Bello, 2008).

1. Cabeza
2. Cuello, nuca
3. Dorso
4. Boca
5. Jeta
6. Oreja
7. Mejilla
8. Nuca
9. Cuello, cerviz
10. Gaznate
11. Cruz
12. Lomo
13. Anca
14. Nacimiento de cola
15. Cola
16. Borla de cola
17. Espalda
18. Encuentro
19. Brazuelo
20. Lacón
21. Pie
22. Pezuña
23. Vientre, abdomen
24. Mama, ubre
25. Pezón
26. Jamón
27. Pierna
28. Pie trasero
29. Pezuña trasera
30. Corvejón, jarrete

(Bello, 2008)

Tabla 2 Constantes fisiológicas (Bello, 2008).

Constantes fisiológicas	Rango
Temperatura corporal	38-39 °C
Pulsaciones por minuto	60-100
Edad a la pubertad	5-6 meses
Edad reproductiva	8-10 meses
Duración del celo	2-4 días
Época de monta	todo el año
Duración de la gestación	92 a 128 días
Crías por parto	6-16 lechones

1.4.2 La androstenona y el escatol

El olor sexual, también conocido como olor a verraco, se detecta básicamente en las piezas más grasas del cerdo y recuerda en cierto modo el olor a orina. En ocasiones va acompañado de un gusto desagradable. En 1968 se identificó al esteroide 5-a-androsten-16-en-3-ona (androstenona) como principal responsable del olor sexual.

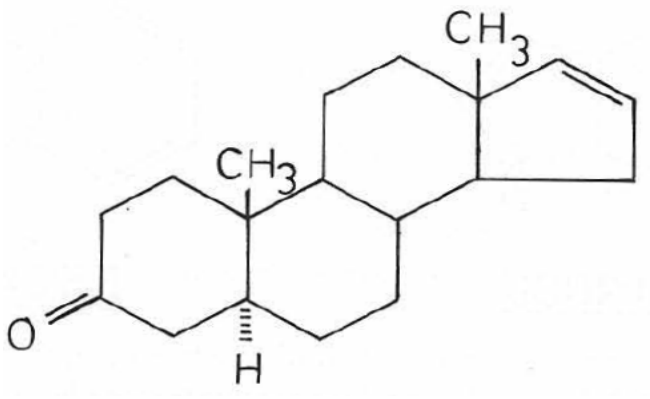


Figura 5 5-a-androsten-16-en-3-ona (Arnau, 2008).

La androstenona se sintetiza principalmente en los testículos, pasando enseguida por las venas espermáticas a la circulación general. A pesar de que los testículos son la fuente principal de excreción de hormonas sexuales y olor de los tejidos de cerdo, también las glándulas adrenales contribuyen en parte, y por tanto, dado que la castración no elimina las glándulas adrenales, no se excluye totalmente la posibilidad de presentar olor sexual (Arnau, 2008).

Muchas de las variaciones en las concentraciones de androstenona en los machos enteros, es explicada por la evolución en el tiempo de desarrollo de la pubertad (Claus *et al*, 1994).

El tiempo medio de circulación de la androstenona es superior a un minuto, pudiendo almacenarse en el tejido adiposo, glándulas salivares, o bien, eliminarse por la orina. El contenido de androstenona en la grasa depende del equilibrio entre la intensidad de producción testicular y del catabolismo. Es decir, el almacenamiento en la grasa de la androstenona sintetizada en los testículos es un proceso rápido. Por otro lado, la desaparición de la androstenona es un proceso lento dependiendo de la intensidad del catabolismo de los esteroides (variable entre individuos) (Arnau, 2008).

El indol y el escatol son sintetizados por actividad microbiana en el estómago de las especies bovinas y porcinas. El triptófano es el precursor común y es degradado a indol por una gran variedad de bacterias (Claus *et al*., 1994).

La androstenona es un esteroide testicular asociado con el olor a orina y el sudor, y es detectable por solamente pocos consumidores, particularmente mujeres (Costa *et al*., 2003).

Se encontró que los niveles de androstenona se mantienen muy bajos en los cerdos prepúberes. Después de 200 días de edad, la concentración de androstenona en el plasma, así como la testosterona, aumentan bruscamente aunque la androstenona presenta un leve incremento antes de la edad señalada. Ambos esteroides bajan sus concentraciones en el plasma después de los 250 días. Sin embargo, las tasas de aumento de los niveles de androstenona presentan gran variabilidad entre los individuos, presentando coeficientes de variación de un 50 al 100 %. En general los niveles de androstenona en grasa aumentan con el peso y la edad, aunque es difícil saber cuál de éstos criterios es más importante en la síntesis y almacenamiento de la hormona. La

madurez es el criterio más determinante de la concentración de androstenona. Puesto que la madurez es un carácter determinado por el genotipo de los animales, algunos autores han buscado diferencias en la concentración de androstenona entre razas. La estimulación sexual de los machos sin castrar produce aumentos en la concentración de androstenona en la grasa y en el plasma. Este incremento puede suceder al criar machos mezclados con hembras o simplemente por peleas entre machos. También la jerarquía social dentro de cada corral afecta a la mayor o menor concentración de esta hormona. Otra familia de compuestos cuya relación con el olor sexual se ha investigado es la del indol-escatol (Figura 6) (Arnau, 2008).

El olor sexual es un olor desagradable, que puede ser percibido durante la cocción de la carne proveniente de los cerdos machos enteros. Esto también puede afectar el sabor de la carne, aunque en menor medida (Bonneau y Lebret, 2010).

A pesar de los niveles de esos componenetes en la grasa, la percepción del olor a verraco es influenciada por otros factores como el tipo de cocción, la temperatura y el tiempo que transcurre entre la preparación y el consumo (Costa *et al*., 2003).

La incidencia del olor a verraco es variable, pero puede aparecer en 75% de toda la población de cerdos machos (Abdulmawjood *et al*., 2012).

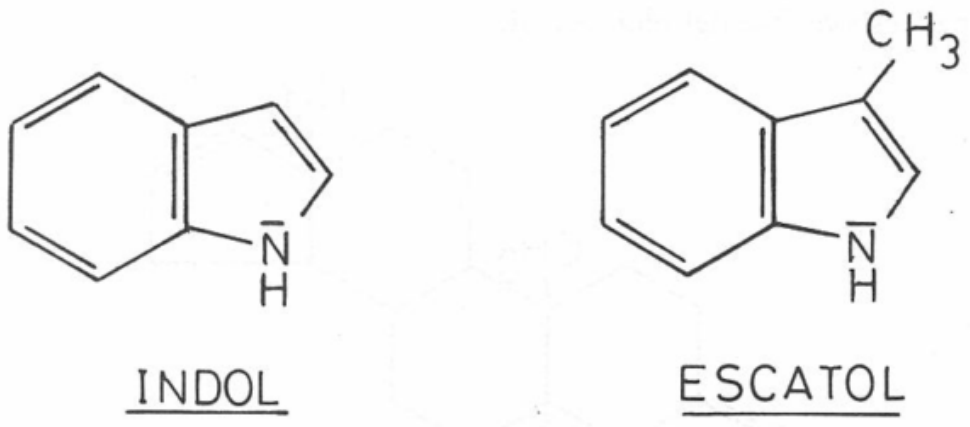


Figura 6 Moléculas de indol-escatol (Arnau, 2008).

El escatol no es específico de la grasa de cerdos enteros, ya que éste se encuentra en cerdos machos, hembras y castrados. Sin embargo se puede tener una posible acción sinérgica con la androstenona. El indol puede producirse mediante bacterias como producto de la degradación del aminoácido triptófano, así como su derivado, el escatol (Fgura 6). Esto ocurre en forma natural en las heces humanas, presentando el indol un intenso olor fecal. El escatol es un producto de degradación del triptófano por las bacterias intestinales y su concentración en la grasa y carne depende mucho más de factores del medio (alimentación, estado sanitario), que de los factores ligados al animal (tipo sexual y tipo genético) (Arnau, 2008).

1.4.3 Técnicas de castración

La castración es una práctica generalizada que consiste en la extirpación de los órganos reproductores (testículos) con el fin de evitar las características de olor que dan a la carne, una vez que han iniciado su proceso final. En algunos casos la castración se realiza en la primera semana de vida del lechón (Monge, 2005).

Pocos países han detenido la castración de los lechones completamente, por ejemplo el Reino Unido o Irlanda, o en partes, por ejemplo en el 70% del territorio de España y Portugal. En estos países los cerdos son usualmente sacrificados antes de llegar a la pubertad y antes de llegar a la madurez sexual para evitar el indeseable olor. El sacrificio de cerdos más jóvenes resulta en canales más chicas con una concentración alta de grasas insaturadas que no son adecuadas para la elaboración de productos de carne especiales. Jamones curados y lomo, por ejemplo, requieren largas piezas de carne con abundante grasa para el procesamiento (Fuchs *et al*., 2009).

Es importante mencionar algunos de los cuidados que hay que tener para que la castración sea satisfactoria. En primer lugar, la zona donde van a estar los lechones una vez castrados debe tener buena higiene y los lechones no deben presentar problemas de diarrea. En la segunda semana, se considera que el lechón está mejor adaptado al medio, los genitales son de fácil manejo y ha logrado una buena adaptación al nuevo proceso alimenticio a partir de la leche materna. Por otra parte, hay algunas enfermedades que son más frecuentes a partir de la tercera semana, lo que justifica la realización de la castración con buenos resultados en la segunda semana. Hay dos tipos de castración: la escrotal y la inguinal. Los médicos concuerdan que el mejor método de castración es la inguinal, porque la región donde se localizan las incisiones no se expone tanto como el

escroto al contacto directo con lugares contaminados; otro de los argumentos es que en esta zona los tejidos cicatrizan en forma más rápida que los escrotales. La única desventaja es que la castración no es realizada por personal especializado debido a los costos que la cirugía implica, pues en la castración inguinal se exponen otros tejidos y, de sufrir alguna lesión durante el corte, podría conducir a la muerte. Por esta razón, en la práctica, el sistema más utilizado es la castración escrotal, con buenos resultados y, en la mayoría de los casos, sin infecciones posteriores o mortalidad. Con respecto a si se debe o no proceder a una suturación, como práctica preventiva de infecciones y complicaciones de la castración, desde el punto de vista práctico y económico, no es aconsejable, ya que es escasa o nula la mortalidad que se ha registrado por este evento. Esto último siempre y cuando se tome en consideración que el sitio de la castración, el equipo y lugares donde se mantengan los lechones después de realizada, garanticen óptimas condiciones de higiene (Monge, 2005).

Pasos por seguir para la castración: en la castración, deben tomarse en cuenta los siguientes aspectos:

a) Sujeción del animal: hay varias modalidades de acuerdo con el gusto. Una de ellas es sujetar al animal de las patas traseras, prensarle la cabeza entre las piernas o guindarle amarrado de las dos patas traseras. Otra forma es ponerlo en una mesa, de espalda, sujetado de las patas traseras y una delantera.
b) Limpieza y desinfección: consiste no sólo en el lavado del área operatoria, sino también del equipo con un desinfectante.
c) Incisión: se debe realizar un solo corte, cuya longitud depende de la edad del lechón, ya que de ésta última depende el tamaño testicular. El corte se debe realizar longitudinalmente cerca del intermedio testicular; se corta luego el dartos y se presiona para la salida del testículo, previo corte de la túnica del testículo correspondiente.
d) Corte: se realiza a unos dos centímetros de donde sale el testículo. Al sacar éste, aparecen el ligamento escrotal, el cual es consistente y de color blanquecino; y el cordón testicular, más frágil y de color rojo oscuro. El ligamento se corta y éste se retrae hacia el interior. El cordón contiene los vasos y nervios testiculares; por ellos y con el fin de evitar una hemorragia, se recomienda amarrar con hilo, aplicar tijera ligadoras u otras, y realizar el corte.

e) Antibióticos: después de finalizar la operación, se debe aplicar un antibiótico en polvo o spray, con el fin de ayudar a cicatrizar, secar y no permitir la entrada de agentes patógenos.

(Monge, 2005)

Inmunocastración (Método utilizado por Pfizer)

La inmunocastración es un método relativamente nuevo. La vacuna que se suministra es la que ofrece Pfizer llamada IMPROVAC. IMPROVAC es una vacuna que permite la castración de los cerdos machos a través de la creación de anticuerpos contra la GnRF (Pfizer, 2010).

En años recientes, la vacuna GnRF ha sido introducida en muchos países. Ésta actúa por medio del eje gónada-pituitaria, hipotálamo y suprime la función testicular a través de la inducción de anticuerpos contra la GnRF. A medida que el efecto principal de ésta vacuna se produce, después de haber aplicado la segunda dosis (la cual es administrada de cuatro a seis semanas antes del sacrificio), las características positivas de los cerdos se mantienen durante la mayor parte del tiempo de engorde. (Fuchs et al., 2009).

Además de conseguir los efectos deseados y de acuerdo con la castración quirúrgica, sus ventajas no son únicamente el ahorrarse el tiempo de castrar lechones y las pérdidas por este manejo, sino la mejora en resultados productivos que presentan. Esta vacuna contiene GnRF modificada para la formación de anticuerpos contra la GnRF del organismo porcino. El eje hipotalámico-hipofisario-gonadal funciona de la siguiente manera (Figura 7):

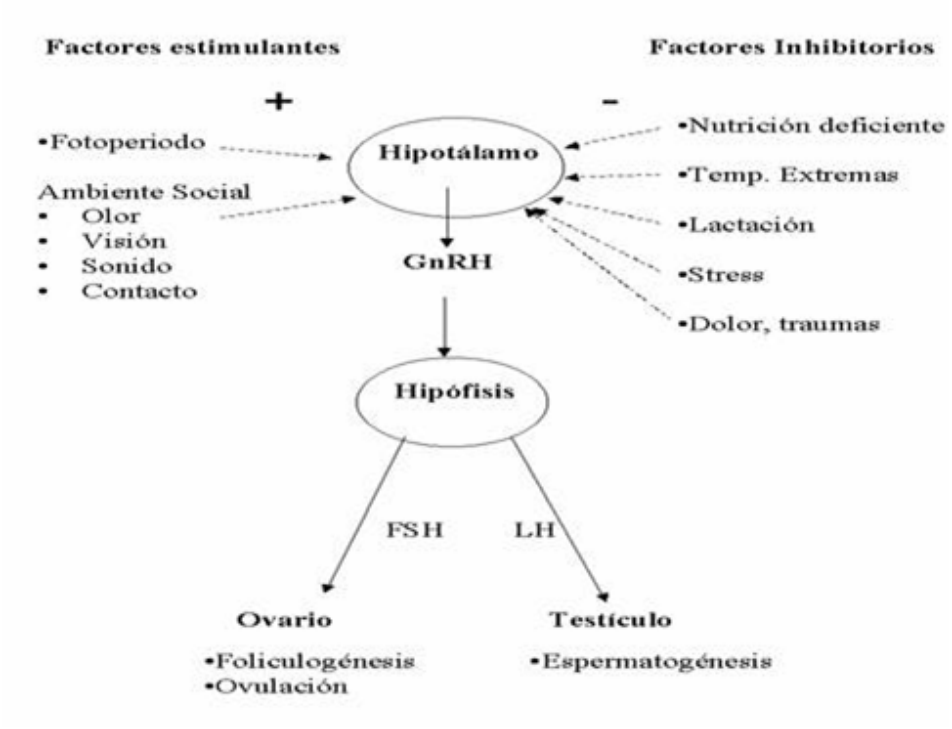


Figura 7 Funcionamiento del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (Pfizer, 2010)

Podemos observar que la neutralización de la GnRH (hormona liberadora de la gonadotropina, responsable de la espermatogénesis) va a impedir la liberación de LH que en los machos es la hormona encargada de la espermatogénesis. En el cerdo, el desarrollo y la función de los testículos están controlados por el factor liberador de gonadotropinas (GnRF), que se segrega en el hipotálamo. El GnRF se une a receptores específicos de la hipófisis y provoca la liberación de hormona luteinizante (LH) y de la hormona foliculoestimulante (FSH). La LH y la FSH actúan sobre los testículos para regular la secreción de esteroides testiculares, entre ellos testosterona y androstenona. Físicamente, veremos una reducción del tamaño testicular aproximadamente a la mitad a partir de la segunda inyección (porque como en la mayoría de las vacunas, ésta necesita vacunación y revacunación).

En el cerdo, el desarrollo y la función de los testículos están controlados por el factor liberador de gonadotropinas (GnRF), que se segrega en el hipotálamo. El GnRF se une a receptores específicos de la hipófisis y provoca la liberación de hormona luteinizante (LH) y de hormona foliculoestimulante (FSH). La LH y la FSH actúan sobre los

testículos para regular la secreción de esteroides testiculares, entre ellos testosterona y androstenona (Figura 8) (Pfizer, 2010).

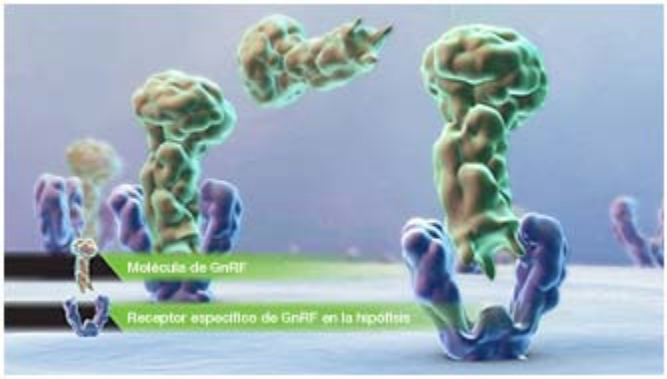


Figura 8 Representación esquemática de GnRF endógeno unido a receptores específicos de la hipófisis (animalhealth.pfizer.com)

Además, también se verán muy disminuidas las conductas de agresividad y de monta que presentan muchos cerdos macho en los cebaderos por lo que, en general, el ambiente en la nave es más calmado y se producen menos lesiones por ataques o por el comportamiento de monta.

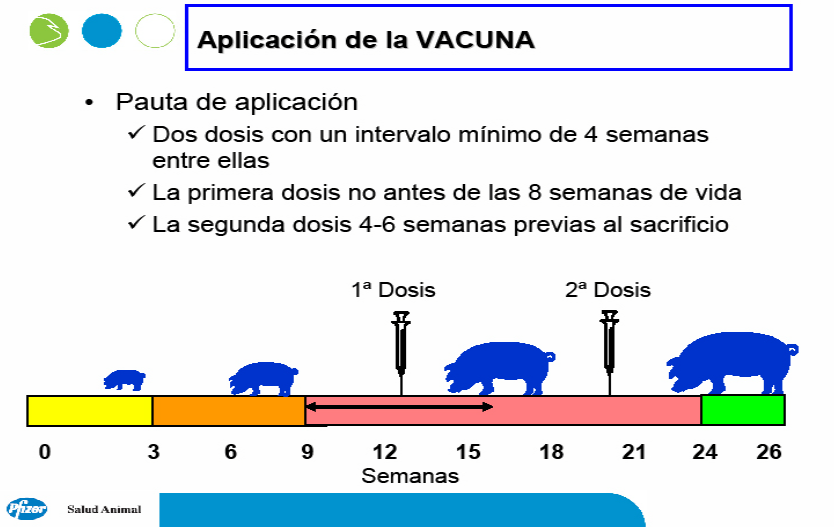


Figura 9 Pautas de aplicación de la vacuna (animalhealth.pfizer.com)

La aplicación es subcutánea y el efecto de la vacuna es temporal, es importante que entre la segunda inyección y el sacrificio no pasen más de 6-7 semanas (se ha comprobado que el efecto dura unas 10 semanas) (Figura 9) (Pfizer, 2010).

No hay diferencias estadísticamente significativas entre los cerdos castrados físicamente y aquellos que fueron inmunizados con la vacuna GnRF, en términos de la media de peso corporal en vivo de los cerdos antes de su primer o segundo día del sacrificio, o los pesos de la canal después del sacrificio. La inmunización con la vacuna GnRF mejora el contenido de carne magra y reduce el espesor de la grasa dorsal. A pesar de obtener un porcentaje menor, sin tener una diferencia significativa, no se pudieron detectar efectos adversos en los pesos de las partes valiosas de la canal como el jamón, el lomo y el hombro. El uso de la vacuna GnRF para controlar el olor a verraco puede contribuir a la producción de cerdos con mayor porcentaje de carne magra y canales con mayor masa muscular (Fuchs *et al*., 2009).

Este es un resumen de los efectos contrastados experimentalmente y en la práctica, de la aplicación de la vacuna GnRF en machos enteros, tanto por Pfizer Salud Animal en distintos países como por el IRTA (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias) en España

- Reducción testicular.
- Disminuye la producción de testosterona.
- Disminuye el olor a verraco: reducción de los niveles de androstenona por la disminución de la testosterona y ésta disminución, a su vez, aumenta el metabolismo hepático y eliminación del escatol.
- Disminuyen los comportamientos de montas y agresividad
- El olor sexual de los animales tratados se reduce a niveles imperceptibles tal y como sucede en los castrados quirúrgicamente.

(Pfizer, 2010).

1.4.4 Normas para el sacrificio

NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1. Esta Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto, establecer los métodos de insensibilización y sacrificio de los animales, con el propósito de disminuir su sufrimiento, evitando al máximo la tensión y el miedo durante este evento.

1.2. La vigilancia de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, así como a los gobiernos de los estados en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.

4. Disposiciones generales

4.1. Durante el manejo de los animales, los responsables deberán mantenerlos tranquilos, evitando los gritos, ruidos excesivos y golpes que provoquen traumatismos.

4.2. Para el arreo, nunca deberá golpearse a los animales con tubos, palos, varas con puntas de acero, látigos, instrumentos punzocortantes u objetos que produzcan traumatismos.

4.3. Los instrumentos, equipo e instalaciones para insensibilizar y sacrificar a los animales serán diseñados, construidos, mantenidos y usados de manera tal que se logre un rápido y efectivo resultado de su uso. Estos deberán ser inspeccionados por lo menos una vez antes de su uso, para asegurar su buen estado.

4.4. Los instrumentos y equipo adecuado para el sacrificio de emergencia, deberán estar siempre disponibles para su uso en cualquier momento. En el caso de no contar con estos instrumentos y equipo adecuado, ya sea en los sitios de producción, durante la movilización o en corrales, podrán utilizarse armas de fuego de suficiente calibre para provocar muerte inmediata, según el animal del que se trate.

4.5. La instalación, uso y mantenimiento de los instrumentos y equipo para el sacrificio humanitario, deberá realizarse de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

4.6. Ninguna persona intervendrá en el manejo, insensibilización y sacrificio de los animales, a menos que cuente con la capacitación específica.

4.7. Los métodos, sustancias y aparatos de insensibilización y sacrificio mencionados en la presente Norma, así como los métodos, sustancias y aparatos alternativos que en un futuro se recomienden, solamente podrán utilizarse cuando su efectividad esté demostrada con estudios avalados por instituciones científicas reconocidas y además cuando cuenten con una patente registrada y la autorización oficial de la Secretaría.

4.8. Ningún animal se sacrificará por envenenamiento, ahorcamiento, ahogándolo, por golpes o algún otro procedimiento que cause sufrimiento o prolongue su agonía.

4.9. Los requisitos zoosanitarios para instalaciones relacionadas con el manejo de los animales de abasto, se deberán cumplir conforme a lo establecido en la NOM-008-ZOO-1994, Especificaciones zoosanitarias para la construcción y equipamiento de establecimientos para el sacrificio de animales y los dedicados a la industrialización de productos cárnicos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de noviembre de 1994.

4.10. El tiempo de descanso de los animales de abasto en los corrales después del transporte, será de acuerdo a lo establecido en la NOM-009-Z00-1994, Proceso sanitario de la carne, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de noviembre de 1994.

4.11. Los propietarios, transportistas, encargados, administradores o empleados de expendios de animales, deben sacrificar inmediatamente en forma humanitaria a los animales que por cualquier causa se hubiesen lesionado gravemente, utilizando los métodos descritos en esta Norma para cada caso.

4.12. Se autorizará el aplazamiento del sacrificio:

a) Si se sospecha que el animal de abasto sufre o padece una afección que lo hace temporalmente inadecuado para el consumo.

b) Si existe la sospecha de que el animal presenta residuos o trazas de sustancias farmacológicamente activas en sus tejidos, que lo hagan inadecuado para el consumo humano.

c) En ambos casos se mantendrá a los animales en locales y con los cuidados adecuados durante el tiempo requerido.

4.13. Todos los animales de abasto llevados al cajón de sacrificio deben ser sacrificados humanitariamente sin demora alguna, previa insensibilización.

4.14. No deberá permitirse que las operaciones de insensibilización y sacrificio de los animales se efectúe con más rapidez que aquella con la que pueden aceptarse las canales para las operaciones de faenado.

4.15. El sacrificio humanitario que se realice en animales que no sean destinados para el consumo humano, solamente podrá realizarse con los métodos autorizados en esta Norma, para la especie de que se trate y en razón del sufrimiento que le cause un accidente, enfermedad, incapacidad física o vejez extrema, imposibilidad para su manutención, riesgo zoosanitario o por exceso en el número de los de su especie, cuando signifiquen un peligro comprobado para la salud pública. Las escuelas de educación superior, institutos e instituciones científicas y de investigación nacionales, podrán realizar el sacrificio humanitario de animales de experimentación, exclusivamente con fines didáctico y de investigación para uso dentro del territorio nacional.

5. Trato humanitario en el sacrificio de los animales de abasto

Métodos de insensibilización y sacrificio por especie.

5.3. Porcinos.

a) Electro insensibilización.- Se puede realizar en cuatro diferentes posiciones para los 2 electrodos, como se indica en el "Apéndice D" (Normativo), la aplicación de los electrodos no deberá hacerse colgando a los animales, se realizará dentro de un cajón de sacrificio con piso de material aislante para evitar la electrificación del piso.

I.- Cada electrodo colocado atrás de la oreja.

II.- Cada electrodo colocado debajo de cada oreja.

III.- Cada electrodo colocado en el espacio entre ojo y oreja.

IV.- Un electrodo entre los ojos y el otro atrás de una oreja.

El voltaje aplicado deberá ser de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

b) Sacrificio humanitario.- Desangrado por corte de vena cava anterior (vena cava craneal) introduciendo el cuchillo abajo del brazuelo izquierdo. Este se deberá realizar dentro de los 20 segundos después de la insensibilización. Debe asegurarse que el animal se encuentra muerto antes de introducirlo al escaldado.

c) Sacrificio.- Desangrado por corte de vena cava anterior. Este se deberá realizar antes de 30 segundos después de la insensibilización. Debe asegurarse que el animal se encuentra muerto antes de ingresar al escaldado.

CAPÍTULO II. PCR

2.1 Autentificación de especies y técnicas

La biología molecular es una herramienta básica para la trazabilidad en el sector alimentario, y en poco tiempo su uso se está generalizando en los procesos conducentes a garantizar la calidad y la seguridad de un alimento. Si bien la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica bastante compleja y requiere personal especializado, en los países desarrollados como la Unión Europea y Estados Unidos de Norteamérica (EUA) ésta técnica está adquiriendo cada vez mayor importancia para evitar los posibles fraudes en el etiquetado de productos. Con estos avances biotecnológicos y sus aplicaciones se ha creado una nueva terminología que engloba la biología molecular con la industria alimenticia y se denomina la trazabilidad genética, que se basa en la identificación a través del estudio del ADN. De hecho, la molécula de ADN se ha caracterizado por ser variable entre los individuos y esta característica permite distinguirlos entre ellos. Las muestras de ADN pueden ser tomadas de cualquier tejido biológico. En la práctica, la toma de éstas debe ser de bajo costo y de ejecución fácil. Los ensayos de trazabilidad genética deben producirse en un formato adecuado para el análisis de laboratorio y constan de cuatro etapas: aislamiento del material genético presente en la muestra, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de

los fragmentos de ADN que se quieran identificar, posteriormente se utiliza la técnica de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLPs) de los productos amplificados o secuenciación de fragmentos de ADN, y por último se puede realizar un análisis filogenético de las secuencias obtenidas, mediante comparación con secuencias conocidas de otras especies (Aguilar *et al*., 2012).

La autentificación es necesaria para evitar prácticas fraudulentas derivadas de la sustitución de las especies más valoradas por aquéllas de menor valor comercial y organoléptico. En la actualidad, las técnicas genéticas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituyen una de las alternativas más específicas para llevar a cabo la diferenciación de especies animales. En la actualidad, las técnicas genéticas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituyen una de las alternativas más específicas para llevar a cabo la diferenciación de especies animales (Rojas *et al*., 2008).

Las técnicas moleculares son consideradas metodologías de las más novedosas para la identificación y cuantificación de especie en productos cárnicos procesados térmicamente o no. Éstas consisten en técnicas basados en el estudio de secuencias específicas de ADN de cada especie, como son la hibridación del ADN, la reacción de la polimerasa en cadena o PCR y la amplificación polimórfica del ADN en forma aleatoria. La principal ventaja de utilizar técnicas analíticas basadas en la identificación de ADN, es debida a que ésta molécula se encuentra en todo tipo de células de un mismo individuo y contiene la misma información genética no importando el origen de la muestra (sangre, músculo, hueso, etc.) la información contenida en el ADN es mayor que la encontrada en las proteínas, debido a que ésta molécula es relativamente termoestable, por lo que es menos susceptible a ser degradado durante el procesamiento de los alimentos, y aún degradado parcialmente permite identificar diferencias (Hernández, 2007).

Alternativamente, las técnicas genéticas y, concretamente, las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen una estrategia idónea para la detección e identificación de especies animales en los alimentos. Los métodos genéticos de identificación de especies presentan importantes ventajas frente a las técnicas basadas en el análisis de proteínas. Fundamentalmente, la pequeña cantidad de muestra requerida para el análisis, el mayor grado de variabilidad genética examinado y la posibilidad de analizar muestras sometidas a distintos tratamientos tecnológicos, incluida la

esterilización. Estas propiedades han convertido a las técnicas de PCR en un sistema óptimo para identificar y cuantificar la presencia de una determinada especie animal, tanto en productos crudos, como en aquéllos sometidos a distintos tratamientos de procesado. Las técnicas de PCR convencionales son útiles para la identificación y la detección cualitativa de distintas especies animales en una mezcla. Sin embargo, la metodología de PCR en tiempo real es más adecuada cuando se pretende cuantificar el porcentaje de incorporación de una especie en un producto (Fajardo *et al*., 2009).

En Italia se han hecho estudios basados en la detección para diferenciación de género en carne de cerdo macho y se ha usado PCR convencional basada en el mismo gen para la detección de la carne de cerdo macho (Fontanesi *et al*., 2008).

Los ensayos basados en el ADN fueron empleados recientemente para la autenticación de carne y productos cárnicos usando un amplio rango de técnicas. Esas técnicas son la hibridación de DNA, análisis de secuencia de DNA, ensayos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando *primers* aleatorios, pares de *primers* universales para análisis de PCR-RFLP y detección por PCR de las especies de carne por pares de *primers* específicos universales. El DNA genómico fue inicialmente el objetivo para la amplificación por PCR de los fragmentos deseados para la identificación de las especies de carne. Sin embargo, en la actualidad el DNA mitocondrial es dirigido para la amplificación por PCR del fragmento deseado para la identificación de especies. La razón de la orientación de DNA para identificación de especies de carne es debido a su alta estabilidad térmica. Después el DNA mitocondrial fue preferido sobre el DNA genómico debido a la herencia materna de los resultados del DNA mitocondrial en un solo alelo en un individuo, las regiones variables del gen mitocondrial contienen un alto número de copias en cada célula junto con su naturaleza altamente conservada en comparación con el DNA genómico y muy pequeñas estructuras de la mitocondria. Todas estas cualidades deseables del DNA mitocondrial mejoraron la sensibilidad y precisión del análisis por PCR en productos cárnicos tratados al calor y una sola copia del fragmento deseado de DNA es requerido para la amplificación por PCR. En estudios recientes, los análisis de PCR específicos para especies fueron desarrollados basados en el DNA mitocondrial para la autenticación de carne y productos cárnicos (Mane *et al*., 2012).

La utilización del PCR en la autentificación de los alimentos presenta ventajas sobre los métodos tradicionales basados en la identificación de proteínas específicas de las

especies, especialmente si se adapta para la amplificación de fragmentos del ADNmt, que se encuentra en gran cantidad de copias por célula, porque exhibe gran variabilidad en los genes, garantizando la discriminación suficiente entre especies diferentes. El emplear ADNmt o ADN nuclear (ADNn) también puede depender de la integridad del fragmento de ADN objetivo. Cuando el ADN se somete a tratamiento térmico puede ser degradado en fragmentos que van, desde menos de 100pb hasta aproximadamente 500pb. En este caso, es más adecuado analizar el ADNmt debido a su abundancia relativa en comparación con el ADNn sumado al hecho que la estructura circular del ADNmt le otorga una mayor resistencia a la degradación inducida por el calor; además es de herencia materna y no tiene la recombinación en todos los vertebrados, de modo que la secuencia de ADN mitocondrial es la más utilizada. En efecto, se ha utilizado el ADNmt para la identificación de especies, incluso en los productos que contengan el material genético posiblemente degradado, como por ejemplo en alimentos procesados térmicamente (Aguilar *et al*., 2012)

2.2 Extracción de DNA

El aislamiento de genes específicos como fragmentos individuales de DNA rara vez es práctico. Por consiguiente, los investigadores interesados en genes de un organismo particular comienzan por la extracción del DNA del organismo, que puede obtenerse a partir de células de cualquier organismo, sea vegetal, animal, o microbiano, mediante la lisis de las células y la precipitación del DNA. Este proceso da como resultado una masa de DNA que incluye el genoma completo del organismo (Tortora *et al*., 2007).

En PCR, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el analito. Por tanto, una buena muestra implica siempre un correcto proceso de obtención de esta molécula a partir de material biológico. La extracción de ADN consta de una etapa de lisis, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido y otra de purificación, que implica la retirada de la solución final de la mayoría de elementos que pueden interferir en la PCR. La extracción del ADN de las células o virus donde se halla confinado es un paso previo en muchos procedimientos analíticos y diagnósticos (Microbial, 2009).

2.2.3 Etapas en la extracción de ADN

Los pasos necesarios para una correcta extracción y purificación del ADN mediante un procedimiento químico son:

1. Lisis de las células o virus. Las sales caotrópicas ayudan a romper la estructura tridimensional de macromoléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos consiguiendo su desnaturalización. La adición de un detergente como el SDS es necesaria a menudo para eliminar las membranas.
2. Degradación de la fracción proteica asociada al ADN. Se consigue mediante la adición de una proteasa. La fracción proteica puede precipitarse mejor con la ayuda de sales como el acetato de amonio o el acetato sódico.
3. Purificación. Consta de 3 fases:
   - Precipitación del ADN. El ADN es insoluble en alcohol, por lo que se puede precipitar etanol frío o isopropanol y recuperar mediante una centrifugación. El alcohol del sobrenadante se llevará las sales añadidas previamente.
   - Lavado del pellet. Se realiza con alcohol frío volviendo a centrifugarse
   - Recuperación. El sedimento se puede resuspender en agua o tampón Tris tras ser secado completamente.

La confirmación de la presencia de ADN se lleva a cabo mediante electroforesis en un gel de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio y observación con luz UV o directamente al espectrofotómetro mediante espectro de absorción de 200 a 350 nm. El ADN purificado se puede cuantificar con un espectrofluorímetro mediante el uso de fluoróforos específicos. El siguiente paso puede realizarse con la ayuda de minicolumnas equipadas con una membrana de sílica que retiene específicamente el ADN permitiendo el paso de las moléculas y sales que acompañan la reacción de lisis.Finalmente se lava con alcohol y se eluye el contenido (Microbial, 2009).

2.3 Cuantificación de DNA

Una vez completada la extracción del DNA, éste debe cuantificarse para comprobar que el proceso de extracción ha tenido éxito y para evaluar su pureza. Dicha cuantificación puede realizarse de manera espectrofotométrica para determinar si la extracción ha sido suficientemente efectiva y el extracto es lo bastante puro, o bien mediante una electroforesis en gel de agarosa (normalmente preparado al 0.8-1% p/v de agarosa) en el espectro espectrofotométrico se determina la absorbancia del extracto de DNA (diluido 1/25) a diversas longitudes de onda para determinar su concentración y su pureza con respecto a otras sustancias que podrían estar incluidas en el extracto (polisacáridos, proteínas, RNA, etc). La medida de absorbancia a 260 nm permite cuantificar la concentración de ácidos nucleicos, mientras que la relación entre ésta absorbancia y la determinada a otras longitudes de onda (por ejemplo, 230 para fenol y polisacáridos, 280 para proteínas) permite determinar la pureza relativa del extracto. Para calcular la pureza mediante las siguientes razones (ratios) de absorbancia se toma en cuenta:

- A_{230}/A_{260}: debe estar comprendido entre 0.3 y 0.9; valores superiores indican la contaminación del extracto por polisacáridos o por restos de fenol resultantes de un mal lavado en el proceso de extracción.
- A_{260}/A_{280}: valores de esta relación situados entre 1.8 y 2.0 indican un alto grado de pureza de ácidos nucleicos; si se hallan entre 1.8 y 1.9 indican una alta pureza de DNA. Valores por encima de 2.0 indican contaminación por RNA, lo cual hace aconsejable la inclusión da la lisis de este RNA utilizando RNAasa en el proceso de extracción. Valores por debajo de 1.8 indican la contaminación del extracto con proteínas, lo que exigiría un mayor cuidado en la eliminación de éstas durante el proceso de extracción o una posterior purificación.

En caso de ser necesario, el extracto puede purificarse de manera adicional, por ejemplo, utilizando columnas de purificación (Sabater, 2009).

2.4 Diseño de primers

Un oligonucleótido de DNA puede potencialmente, emparejarse con muchos sitios del genoma, quizá con uno o algunos desajustes, llevando a resultados falsos-negativos. En consecuencia, los sitios diana deseados de DNA genómico de cadena sencilla o RNAm son plegados en estructuras secundarias estables que pueden ser desenrolladas para permitir la hibridación del oligonucleótido (Yuryev, 2009).

El diseño de “primers” tiene dos objetivos: especificidad y eficiencia de amplificación. Especificidad es la frecuencia de los eventos correctos de los “primers”, cuando los cebadores no son los correctos llevan a amplificaciones fuera de objetivo. Eficiencia es el incremento de producto en cada ciclo de PCR, el óptimo teórico es de dos veces. La aplicación determina el balance entre estos parámetros. Por ejemplo, en diagnósticos, la eficiencia es sacrificada por una mayor especificidad, minimizando los falsos positivos a costa de menor cantidad de producto en la PCR. Estos dos parámetros son controlados por factores como la temperatura, tiempo de extensión, longitud del amplicón, cationes divalentes (Mg^{2+}, Mn^{2+}), y los detergentes (Álvarez, 2013).

Los cebadores son secuencias cortas de ácidos nucleicos (es decir, oligonucleótidos, por lo general de 20 a 30 nucleótidos de longitud) que se seleccionan para que se hibriden de manera específica con un ácido nucleico en particular y en esencia funcionen como sondas. La abundancia de datos de secuencias génicas disponibles permite el diseño de cebadores específicos para diversos patógenos microbianos y para sus genes de factores de virulencia o resistencia a los antibióticos. Por ende el diseño de la secuencia de nucleótidos del cebador depende del ácido nucleico diana que busque, como genes específicos de género o de especie, genes de virulencia o genes de resistencia a antibióticos. La técnica de PCR puede ser utilizada en varias formas dentro del trabajo de investigación: para diagnóstico, para análisis filogenético, para identificar y clonar secuencias de interés (secuencias codificadoras, genes), etc. Muchas veces no se cuenta con los iniciadores descritos en la literatura para estos fines, y se tendrán que diseñar nuevos oligonucleótidos para obtener los resultados. Existen programas de computación para estos fines, e incluso se pueden utilizar programas disponibles en páginas web. Como reglas generales se puede considerar:

- Diseñar oligos no mayores de 30 bases

- Que presenten temperaturas de fusión similares
- Evitar que las secuencias de los iniciadores se solapen, sobre todo en el extremo 3´, ya que puede ocasionar la formación de dímeros que disminuyen el rendimiento final de la reacción.
- Para el caso de diagnóstico, se deben diseñar los oligos contra secuencias blanco que sean altamente repetidas (Zavala, 2005).

La temperatura media es la temperatura a la cual la mitad de la hebra de los cebadores se une al objetivo. Esto depende de la composición de las bases y puede ser estimada aproximadamente con:

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

Sin embargo, ésta ecuación deja de lado la dependencia de la Tm en la concentración de la hebra, concentración de sal y secuencia de bases. Los errores típicos de éste método en comparación con la determinación de la Tm experimentalmente pueden ser >15°C (Álvarez, 2013).

Una vez diseñados y seleccionados los oligos, se pueden enviar a sintetizar a diversas casas comerciales. La estandarización de la reacción de PCR deberá llevarse a cabo tomando en cuenta las variables descritas anteriormente (Zavala, 2005).

Los cebadores se diseñan para ser utilizados en pares que flanquean la secuencia diana en estudio. Cuando el par de cebadores se mezcla con DNA diana desnaturalizado, un cebador se aparea con un sitio específico en un extremo de la secuencia de una cadena diana mientras que el otro cebador lo hace con un sitio específico en el extremo opuesto de la otra cadena diana complementaria. Por lo general el diseño de los cebadores determina que la distancia entre ellos en el DNA diana sea de 50 a 1000 pares de bases. El proceso de apareamiento se lleva a cabo a 50-58 °C o más. Una vez que se forman los dúplex empieza el último paso del ciclo, que limita el proceso de replicación del DNA (Forbes, 2007).

La temperatura media depende del contenido de la base. Dos “primers” con una longitud diferente pueden tener la misma temperatura media, pero el más largo se aparea menos eficientemente que su pareja, afectando así la eficiencia de la PCR. Una diferencia en la Tm entre los pares afectará la especificidad (a menores temperaturas de apareamiento, el

“primer” con la Tm más alta, será más propenso a no aparearse) y la eficiencia (a mayores temperaturas, el “primer” con menor Tm se apareará con menos frecuencia o no lo hará del todo). Por lo tanto, el punto clave es no coincidir en la Tm, pero sí en la misma cantidad de cebadores unidos al objetivo: para hacerlo, se diseñan “primers” que se conjuguen con la ΔG° a la temperatura de apareamiento deseada (Álvarez, 2013).

El diseño de “primers” es uno de los aspectos más importantes de la PCR. “Primers” mal diseñados pueden amplificar otros fragmentos de ADN distintos a los buscados (amplificación inespecífica). En el diseño de los mismos se ha llegado a diversos parámetros tales como:

- Cada “primer” individual debe contar con una longitud de 18-25 bases.
- Se debe mantener un contenido de G:C (Guanina:Citosina) entre 40 y 60 %.
- Los dos “primers” del par deben de tener una Tm cercanos, dentro de los 5 °C.
- La secuencia de los primers individuales debe iniciarse y terminarse con 1 o 2 bases púricas.
- Secuencias adicionales pueden ser agregadas en el extremo 5’ del primer (no incluir cuando se estima la Tm del primer).
- Se pueden agregar modificaciones en algunas posiciones del primer:
  - Se incrementa el riesgo de amplificación inespecífica.
  - Se disminuye la concentración en la mezcla de cada uno de los primers posibles (Yuryev, 2009).

2.5 La técnica de PCR

2.5.1 Fundamento y antecedentes

La PCR consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN. La química de la PCR se basa, como muchas otras técnicas de biología molecular, en la complementariedad de bases de ADN durante el calentamiento, en que se propicia que los puentes de hidrógeno que estabilizan la doble hélice se rompan y sus dos cadenas se separen. A este proceso se le llama desnaturalización o fusión del ADN. Si la solución de ADN se deja enfriar, la doble hélice se restaura (renaturaliza) debido a la complementariedad de sus bases. Para que esto ocurra, es necesaria la presencia de una enzima: la ADN-polimerasa, misma que cataliza la replicación del ADN mediante la adición de nucleótidos complementarios de la hebra

molde del ADN a un extremo 3´ libre de la hebra naciente. Ésta enzima requiere además de ADN molde, el cual se denomina primer o cebador, es decir un fragmento de ADN monocatenario que hibride con el ADN molde, y que suministra el extremo 3´libre a partir del cual ocurre la polimerización (Hernández, 2007).

La reacción en cadena de la polimerasa, ya más conocida como PCR, es una técnica que permite replicar pequeñas cantidades de ADN. El producto que se obtiene al finalizar la reacción es una gran cantidad de un fragmento génico con alto grado de pureza. Por su alta sensibilidad, esta técnica permite identificar un gen a partir de una muy pequeña muestra de material biológico. Los genes son porciones de ácido desoxirribonucleico (ADN) que tienen la información necesaria para la fabricación de los ácidos ribonucleicos (ARN) y, en última instancia, a través de éstos, de las proteínas: el ARN "copia" el mensaje contenido en el ADN y a partir de él da lugar a la correcta formación de la cadena o secuencia de aminoácidos que constituyen las proteínas. Todos los genes están compuestos por la misma materia prima: una sucesión de nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un grupo fosfato, un azúcar con cinco carbonos (la desoxirribosa) y una de las siguientes bases nitrogenadas: adenina, timina, guanina o citosina. Los genes se distinguen por el orden o secuencia en la que estas cuatro bases se disponen a lo largo de la molécula de ADN. Por otra parte, cada gen es una unidad de información sin solución de continuidad respecto del resto del ADN en el que está inmerso. Esto significa que a todo gen lo preceden y suceden otras secuencias de ADN que, en general, no tienen relación con él (Freifelder, 1981).

En 1986, K. Mullis, un investigador de la Corporación Cetus, inventó un método para lograr la multiplicación *in vitro* de fragmentos definidos de ADN sin necesidad de recurrir a los vectores y su replicación en bacterias. Este método revolucionaría en corto tiempo el conjunto de técnicas de la biología molecular. Su uso se extendió rápidamente a miles de laboratorios, no sólo de investigación básica, sino también de diagnóstico clínico. Se trata de la reacción en cadena de la polimerasa, ya muy conocida como PCR, siglas provenientes del inglés *Polymerase Chain Reaction*. Esta técnica permite amplificar, pequeñas cantidades de ADN. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas. Puede ser, por ejemplo, ADN nuclear total (Tortora *et al*., 2007).

2.5.2 Zona de Amplificación

El método se basa, en su forma más simple en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. La muestra se calienta, en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN, hecho que se conoce como "desnaturalización". En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el "apareamiento" de cada una de las cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Se trata de segmentos de ADN de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar. Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se denomina "iniciadores" o *primers*, debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde. En tercer lugar, una enzima ADN polimerasa extiende los *primers*, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquélla a la cual "trabaja" la enzima ADN polimerasa. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los *primers*. Si se comienza con un fragmento de DNA del tamaño de un gen la PCR puede utilizarse para formar literalmente miles de millones de copias en solo unas horas.

1. Cadena del DNA diana actuará como molde para la síntesis de DNA
2. A este DNA se le agregan los cuatro nucleótidos (para que se ensamblen en el nuevo DNA) y la enzima para catalizar la síntesis, la DNA polimerasa. También se agregan fragmentos cortos de ácidos nucleicos denominados cebadores para ayudar a iniciar la reacción. Los cebadores son complementarios de los extremos de DNA diana.
3. Por ende, formarán un híbrido con los fragmentos que se van a amplificar.

4. La polimerasa sintetiza cadenas nuevas complementarias
5. Después de cada ciclo de síntesis de DNA se calienta para convertir todo el DNA nuevo en cadenas simples. A su vez, cada cadena de DNA recién sintetizada actúa como molde para formar más DNA nuevo (Tortora *et al*., 2007).

La técnica de la amplificación se basa en la repetición de tres procesos.

- La desnaturalización de las dos cadenas de DNA a una temperatura elevada (cerca de 95°C) para producir moléculas de DNA monocatenarias;
- La hibridación (*annealing*) de cebadores oligonucleótidos (*o primers*) complementarios a las secuencias de los extremos de DNA a amplificar (para ello se baja la temperatura a valores normalmente comprendidos entre 40 y 65°C).
- La reacción de elongación a partir de los cebadores usando una DNA polimerasa termoestable (para la *Taq* polimerasa la temperatura óptima es de 72°C).

Los productos de la elongación se desnaturalizan de nuevo por calor y se repite el proceso, de manera que a cada ciclo el número de copias de DNA se dobla, obteniéndose 2^n moléculas después de n ciclos (por ejemplo, 1.048.576 moléculas después de 20 ciclos) (Tagu, 2006).

En cada ciclo de amplificación, el fragmento de ADN diana aumentará en el número de copias de forma exponencial (Figura 10). Esto provoca que, al final de un programa básico, se obtengan aproximadamente hasta 100 millones de copias del fragmento deseado (Tortora *et al*., 2007).

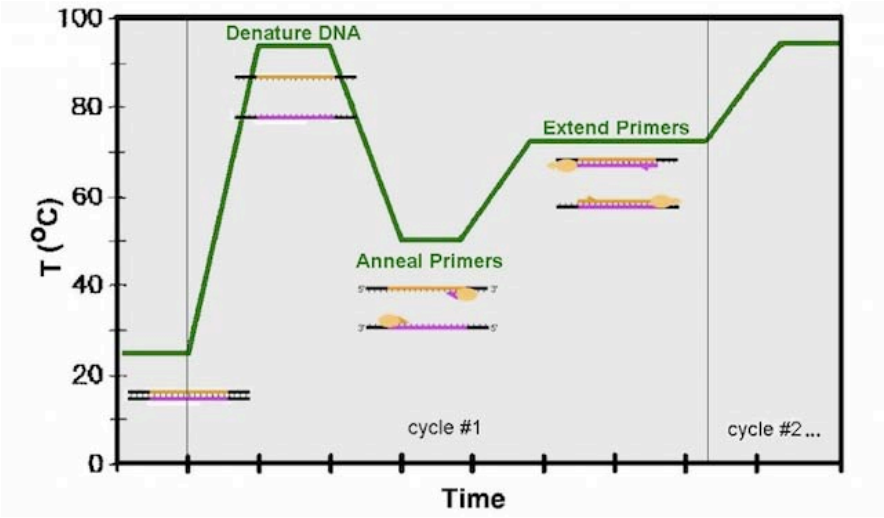


Figura 10 Proceso de amplificación (www.blogdelaboratorio.com)

Las variaciones de tiempo dependen principalmente de la longitud de los fragmentos. Cuanto más tiempo mayor es el fragmento a amplificar. La clave de una buena eficiencia depende de los diseños de las reacciones de PCR que se deben ajustar a las condiciones de cada reacción (Figura 11) (Tortora *et al*., 2007).

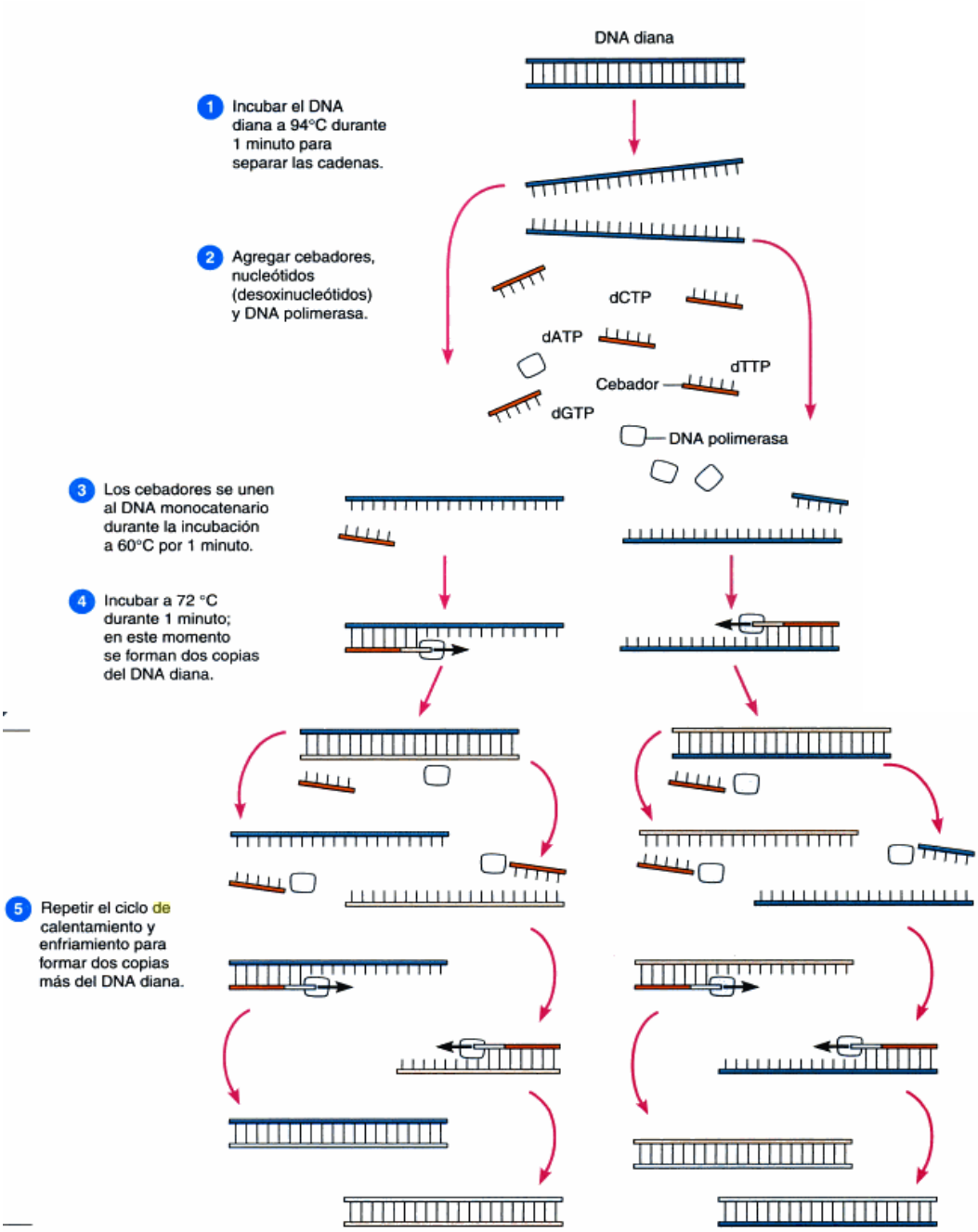


Figura 11 Proceso de la PCR ((Tortora *et al*., 2007).

Como resultado, el proceso sigue una curva exponencial de crecimiento. Todos los reactivos necesarios se agregan a un tubo que se coloca en un termociclador. Este aparato permite fijar las temperaturas, los tiempos y el número de ciclos deseados (Tortora *et al*., 2007).

Para replicar el ADN, la técnica PCR hizo uso, en un principio, de la ADN polimerasa de la bacteria *Escherichia coli*. Pero esta enzima resulta desactivada debido a la alta temperatura requerida para desnaturalizar la doble cadena del ADN, por lo cual debía agregarse enzima fresca al comenzar el tercer paso de cada ciclo. Este inconveniente fue solucionado de manera ingeniosa cuando se la reemplazó por su equivalente de la bacteria "termófila" *Thermus aquaticus*. En efecto, la ADN polimerasa de este microorganismo, denominada Taq polimerasa, actúa eficientemente entre los 75° C y los 80° C y resiste más de dos horas a 93° C. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados. La técnica PCR es el método de detección de secuencias de ADN más sensible conocido hasta la fecha: mediante ella resulta posible identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide. Es, por lo tanto, un instrumento extremadamente valioso para establecer, por ejemplo, lazos de parentesco (ibt-unam, 2009).

La reacción de PCR se prepara mezclando algunos componentes y añadiendo agua desionizada, hasta alcanzar el volumen deseado y la concentración requerida de cada componente. Existen kits comerciales que traen los componentes premezclados, lo que simplifica notablemente el proceso. Para la realización práctica se precisan en la mezcla de la reacción los siguientes reactivos:

- Se necesitan dNTP's, como sustrato para la síntesis de copias del DNA, deben ir acompañados de Mg_2^+(Cl Mg) para ser reconocidos por la polimerasa.
- Dos iniciadores de cadena sencilla, generalmente sintéticos de 18 a 30 nucleótidos, sus secuencias deben ser complementarias a los dos extremos 3' de la región diana, uno en cada hebra, de modo que los oligonucleótidos puedan actuar como cebadores para la replicación de las dos hebras en la región diana. La posición donde hibridan los cebadores es la que define la longitud del fragmento que se amplifica (secuencia diana).
- La enzima DNA polimerasa que es termoestable, es enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas. Esto permite que actúe en ciclos cortos sucesivos sin inactivarse; además, la replicación a temperaturas elevadas impide la formación de híbridos parcialmente dispares y contribuye a la especificidad y

rendimiento del proceso. La enzima más utilizada es la Taq polimerasa procedente de la bacteria *Thermophilus aquaticus.* Tiene como inconveniente el carecer de actividad correctora de pruebas, por lo que la frecuencia de error es superior a la de la replicación, de ahí que en ciertas ocasiones es sustituida por otra enzima polimerasa termoestable.

(Andrade, 2006)

2.6 Preparación del gel de agarosa

Hay diversos factores a tomar en cuenta para la preparación del gel. Hay numerosos tipos de agarosa que se pueden utilizar. La elección de la agarosa más adecuada va a determinar el resultado del trabajo. A la hora de elegir una agarosa hay que tener en cuenta el tamaño de los fragmentos que se quieren separar, el uso que se va a hacer del gel preparativo o analítico, la aplicación posterior del material que se va a separar. Las concentraciones de agarosa que se utilizan de forma más común para separar ácidos nucleicos se encuentran en el rango de 0.5% - 4% (incluso 0.3% si se utiliza agarosa D5). La concentración apropiada en cada caso depende del tipo de agarosa y del tamaño de los fragmentos que se quieren separar. Como regla general hay que tener en cuenta que, a mayor concentración menor es el tamaño de los fragmentos que se separan. Existen dos tipos de buffers que se pueden utilizar en la preparación de geles que son el TAE y TBE. Los dos buffers son similares, y se pueden utilizar de forma indistinta con cualquier tipo de agarosa, pero tienen diferentes propiedades que los hacen apropiados para diferentes aplicaciones. TAE buffer tiene baja fuerza iónica y baja capacidad tamponante lo que hace necesario la recirculación del buffer cuando los tiempos de electroforesis son largos. TBE buffer tiene alta fuerza iónica y alta capacidad tamponante lo que permite trabajar sin recirculación en electroforesis largas. Se recomienda para separación de fragmentos pequeños y con pequeñas diferencias de tamaños entre ellos. Ambos buffers, TAE (1X) y TBE (1X o 0.5X), se pueden utilizar de forma indistinta, Hay que tener en cuenta que el buffer TBE tiene menor movilidad y da mejor resolución para fragmentos < 1kb, mientras que para fragmentos >10kb, con el buffer TAE se obtiene mejor resolución. En caso de gel preparativo, en el cual se quiere recuperar el DNA del gel para una manipulación posterior, se recomienda utilizar buffer TAE, ya que cuando se utiliza TBE el

boro presente en este buffer interacciona con los grupos hidroxilos del polisacárido formando complejos que dificultan la recuperación del DNA. Para correr la prueba de electroforesis es necesario aplicar un determinado voltaje. El voltaje recomendado es 4-10 votl/cm (distancia entre el ánodo y el cátodo, no longitud del gel) en electroforesis horizontal. Cuando el voltaje es demasiado bajo la movilidad de las bandas se reduce, y las bandas se ensanchan debido a la difusión. Cuando el voltaje es demasiado alto disminuye la resolución, debido principalmente al sobrecalentamiento del gel. La cantidad de DNA que se debe cargar por pocillo es variable. Lo importante es la cantidad de DNA que haya en las bandas que se quieran separar. La cantidad de DNA mínima que puede ser detectada mediante tinción de DNA es 10 ng. La cantidad máxima de DNA que puedes tener en una banda que aun sea clara y bien definida es 100 ng aprox. Estas cantidades pueden variar si se utiliza otro sistema de tinción. Para asegurarse de cuál es la cantidad adecuada, se pueden cargar varias líneas con cantidades diferentes. Para la disolución del gel cualquier método es recomendable. El más cómodo y rápido es la disolución en microondas. Para concentraciones altas, donde la disolución se hace más difícil debido a la viscosidad y formación de espuma, la disolución en baño de agua a ebullición facilita la misma. La disolución mediante autoclave es muy bueno para concentraciones muy elevadas y cuando se quiere obtener una solución estéril (Condalab, 2010).

2.7 Electroforesis

2.7.1 Fundamento

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga-masa (Freifelder, 1981).

La mayoría de los polímeros biológicos poseen carga eléctrica y, por lo tanto, son capaces de migrar bajo la influencia de un campo eléctrico. Una forma usual de caracterizar una macromolécula es la determinación de la velocidad con que se mueve al someterla a un campo eléctrico. Esta propiedad puede ser utilizada para calcular el peso molecular de una proteína, para distinguir moléculas por su carga neta o su forma, para

detectar cambios de aminoácidos, de restos polares o no polares y viceversa, y para separar cuantitativamente distintas especies moleculares (Harvey y Arnold, 2005).

2.7.2 Tipos de electroforesis

Existen diferentes tipos de electroforesis: de frente móvil, zonal y continua.

En la electroforesis de frente móvil, las macromoléculas están presentes en toda la disolución y su posición (el frente que separa la disolución del disolvente) se determina en función del tiempo por óptica. Éste método, que es equivalente en muchos aspectos al de frente de sedimentación, es una técnica analítica que ha sido utilizada principalmente para la determinación de las movilidades y puntos isoeléctricos de las proteínas. Sin embargo, dada la poca utilidad de la determinación cuantitativa de la movilidad, la electroforesis de frente móvil es muy poco usada (Freifelder, 1981).

En la electroforesis móvil o libre las partículas se mueven de forma libre en el medio en el que se encuentran dispersas. En 1930 A. Tiselius desarrolló el primer prototipo de electroforesis libre donde la movilidad (μ) de una molécula en un campo eléctrico viene dada por la velocidad de emigración (V) respecto a la fuerza del campo en cuestión (E).

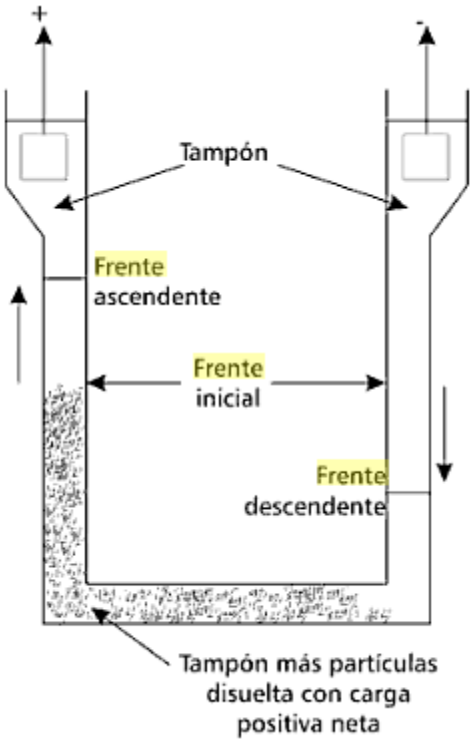
$$\boldsymbol{\mu}\,(\boldsymbol{volt}-\boldsymbol{s}) = \boldsymbol{V}\,(\boldsymbol{cm}/\boldsymbol{s})/\boldsymbol{E}\,(\boldsymbol{volt}/\boldsymbol{cm})$$

Éste método es muy complicado, ya que representa una gran dificultad para mantener una superficie de separación nítida y conseguir una separación completa de las diferentes partículas presentes en el medio.

La parte base del instrumental necesario es la célula; normalmente ésta célula presenta forma de U (Figura 12), aunque actualmente se tiende a células con secciones rectangulares ya que ofrecen mejores resultados. La célula presenta unas dimensiones de 8.4 cm de altura y 0.75 cm^2 de sección, y se encuentra dividida en tres zonas. El volumen de ésta célula es que ha originado la tendencia a realizar micro-electroforesis en soporte, ya que la cantidad de material necesario no siempre podía lograrse. Los electrodos empleados suelen ser de plata o de cobre, aunque pueden ser de cualquier material; para evitar que se alteren con facilidad debemos cambiar la polaridad de estos electrodos en sucesivos usos. Para seguir el movimiento de las diferentes partículas a lo largo de la célula podemos utilizar diferentes métodos; si la muestra en estudio es coloreada o puede reaccionar con el electrolito presente es muy fácil realizar el seguimiento. De lo contrario

utilizaremos métodos ópticos como el índice de refracción, que es diferente para cada partícula y puede ser determinado a lo largo de la célula sin grandes complicaciones (García, 2006).

Figura 12 Electroforesis en U (García, 2006)



En la electroforesis zonal, la disolución a tratar se aplica como una mancha, o como una banda, y las partículas migran a través de un disolvente, utilizando además un medio soporte inerte y homogéneo, tal como el papel o ciertos tipos de geles. Esta técnica es utilizada para analizar mezclas, para determinar la pureza de una muestra, para detectar cambios de movilidad o de conformación y para la purificación de sustancias (Freifelder, 1981).

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS): dado que muchas proteínas o ácidos nucleicos de tamaño y forma diferentes tienen relaciones carga-masa idénticas, la electroforesis de estas macromoléculas en solución se traduce en muy escasa o nula separación. No obstante es posible la separación de proteínas y

ácidos nucleicos mediante electroforesis en distintos geles (suspensiones semisólidas en agua) en lugar de soluciones líquidas. La separación electroforética de proteínas se suele efectuar en geles de poliacrilamida. Cuando una mezcla de proteínas se aplica a un gel y se le pasa corriente eléctrica, las proteínas más pequeñas migran más rápido a través del gel que las proteínas más grandes (Harvey y Arnold, 2005).

Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre sobre geles porque el gel sirve como un tamiz molecular que potencia la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros del gel se desplazan fácilmente a través, mientras que las moléculas mucho mayores que los poros permanecen casi inmóviles. Las moléculas de tamaño intermedio se desplazan a través del gel con diversos grados de dificultad. La electroforesis se lleva a cabo en un bloque delgado. Los geles de poliacrilamida, formados por la polimerización de la acrilamida entrecruzada por metilbisacrilamida, son el soporte preferido para la electroforesis porque son inertes químicamente y se forman con facilidad. Se puede examinar la eficacia de un protocolo de purificación analizando una parte de cada fracción por electroforesis. Las fracciones iniciales mostrarán desde docenas hasta centenares de proteínas. Conforme progrese la purificación, el número de bandas disminuirá y la importancia de una de las bandas aumentará. Esta banda es la que corresponderá a la proteína de interés (Berg *et al*., 2008).

CAPÍTULO III ESTRATEGIA METODOLÓGICA

3.1 Justificación

Por lo antes descrito, hay gente en la Unión Europea que exige, según un estudio realizado, carne de cerdo proveniente sólo de hembras y ayudar así a solucionar este problema (Abdulmawjood *et al,* 2012). En nuestro país el tema sobre la carne de cerdo macho y la castración, no es muy conocido. El presente proyecto se realiza con la finalidad de informar sobre el problema y abarcar una posible solución. Como una alternativa se plantea una propuesta para la diferenciación de género en la carne de cerdo, basados en la detección de primers específicos, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para así poder establecer un método fácil y rápido para la diferenciación de género en carne de cerdo y productos cárnicos de cerdo.

3.2 Problema

Propuesta para identificación molecular del género en carne de cerdo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

3.3 Objetivo general

Proponer aplicación de la técnica de PCR para la diferenciación de género en carne de cerdo

3.4 Objetivos particulares

3.4.1 Objetivo particular 1

Proponer obtención de secuencias de DNA de carne de cerdo que permita elegir la zona de amplificación y primers por medio de programas bioinformáticos y verificar la disponibilidad de secuencias de la especie *Sus scrofa domestica* que permitan la diferenciación por género y programa de PCR.

Actividad 1.1

Revisión bibliográfica en el GENBANK

3.4.2 Objetivo particular 2

Propuesta de obtención de muestras de carne de cerdo (macho y hembra) provenientes de centros de sacrificio (control positivo), expendios y productos comerciales.

Actividad 2.1

Obtener muestras de cerdo macho y hembra para control positivo provenientes del rastro para verificar la autenticidad de las muestras.

Actividad 2.2

Adquirir muestras de carne de cerdo (10 muestras) en 5 expendios distintos de diferentes regiones dedicados a la venta de carne de cerdo (entre otras)

Actividad 2.3

Adquirir en 3 tiendas departamentales, 10 distintas muestras de productos cárnicos provenientes de cerdo (jamón, tocino, longaniza, paté y/o salchicha)

3.4.3 Objetivo particular 3

Propuesta de extracción de ADN de todas las muestras obtenidas previamente mediante la técnica de extracción de ADN propuesta por Sambrook, J. 2001.

Actividad 3.1

Adicionar a la muestra solución de lisis y proteinasa K

Actividad 3.2

Incubar la enzima a 50°C por 2 horas.

Actividad 3.3

Desactivar la enzima a 60 °C por una hora

Actividad3.4

Adicionar la solución fenol-cloroformo

Actividad 3.5

Centrifugar a 10 rpm por 10 minutos

Actividad 3.6

Recuperar la fase superior

Actividad 3.7

Adicionar etanol frío

Actividad 3.8

Centrifugar a 10 rpm por 10 minutos

Actividad 3.9

Secar el ADN en incubadora a 31 °C

Actividad 3.10

Resuspensión del ADN con agua libre de nucleasas

Actividad 3.11

Cuantificación de ADN por medición de absorbancia a 260nm.

3.4.4 Objetivo particular 4

Propuesta para aplicación del protocolo de amplificación PCR, para confirmar la identificación y/o presencia de los géneros de las especies de interés.

Actividad 4.1

Aplicar el proceso de obtención molecular para la diferenciación.

Actividad 4.2

Preparar el gel de agarosa.

Actividad 4.3

Realizar la prueba de electroforesis horizontal

Actividad 4.4

Analizar el amplificado.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Para la revisión bibliográfica se seleccionó una secuencia de un gen especifico que codifique para una enzima que diferencie a *Sus scrofa domestica* de otras especies, asimismo la secuencia que permita la diferenciación del género, mediante la búsqueda en el GenBank.

Se busca la secuencia del gen seleccionado (AMELX y AMELY) (Figura 13, 14).

Figura 13 Secuencia del gen para la especie *Sus scrofa domestica (hembra)*

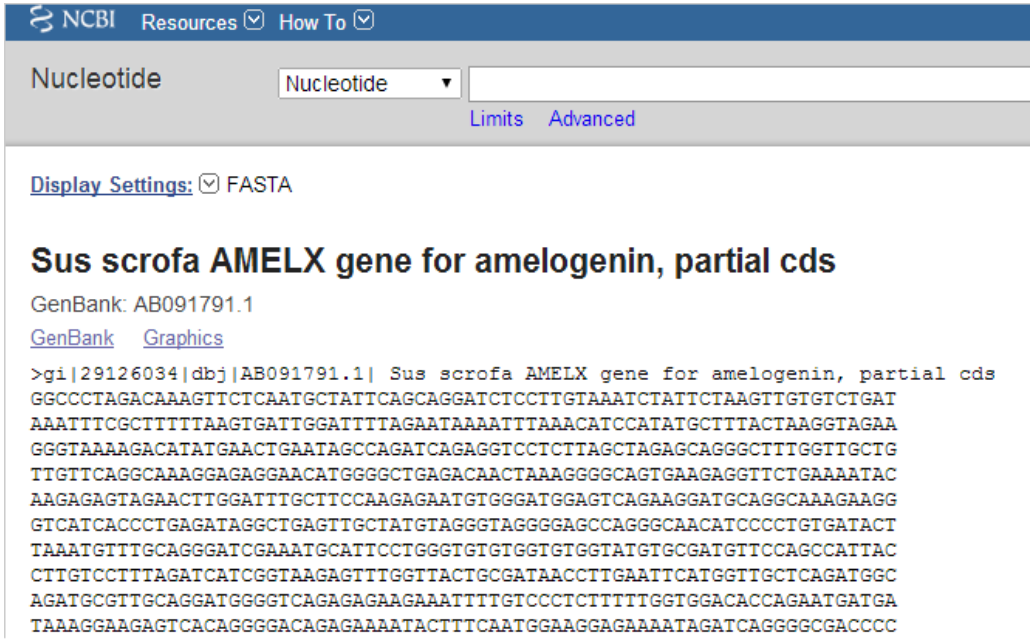


Figura 14 Secuencia del gen para la especie Sus scrofa domestica (macho)

NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide

Limits Advanced

Display Settings: FASTA

Sus scrofa AMELY gene for amelogenin, partial cds

GenBank: AB091792.1

GenBank Graphics

```
>gi|29126036|dbj|AB091792.1| Sus scrofa AMELY gene for amelogenin, partial cds
TAAGAAAGACTATTGCTACATAGAATGGTGGTATATACTCTGTTTAAGTATATGTGTATTGTGTATTTAA
GTATATGCGTTACATGCATATTGCCTTGTCTTTCAGACCAGTATTGTTTAAAAGTATTGCTACTATGATA
ACCTATCTTGCTTTGGTGGCCAATACATTTTACACTGGGGCTAAGGAAGATAGATTTTTGTCCCTTATTT
GGGGTAGACAACTACAATGGTGATCAGGGGGTAATCACAGGGAAAAGAAGACACACCTTCAATGAAAGCA
GAAAATAGAGCAGTGTTGATTCCAAAATGGTAACTCCCTCAAATACAATGTCATAACATGTTCTTAAAAG
TAAACTTGAACACATCAGCAAGTTCAGTCAGCCAATTTACTGACTTAAAAATAGTCCAGTAAATTCTTTT
TGCTTGTTAAACCCATTATTTCCTATAATGAAAAACTGTGTACCCTAATCACAATATATCATTTTAAATT
TGCCTACATTTGCTAAAAAATCATGATACAAGGATTTTTAGTTATATTGCACACATTTTTCTCTTTCCAA
AATATGATTGGTTGTTCTAGATACTATGAATGATATAAATTGAGCTCATCCTTGGAAGAAATCTAAAAGC
TCCAGCATCCTTGATTTTCAGATAGAAGCTCTCTCTGGGTACATTCAAAGGTGTGTAGATTTTATTCATG
AATTCATACACTTTCTATCATGTATCCTTTCTGTTGTGCTTCTTGGTTTCTCTGTATTTCATGTTATCAG
ATGCAGAGATATTCCACATTTCTCATACTTTATGCTTCCACAATAACATTCTTTGGACTATAATTGAATT
AGTCTTTGATTATTTTGATGACTTAAAGTTTTACTTTTTAGTGTAACAAAGTATTTGCCTATTTTAATTC
GAGTTCCAGAACTTAAAAGGACTTTCTAAAACCAGGAAATATTTATTTTAATCTTTTACCTATTACTAAA
ATTACATTTTTAAGCTATGATTTATTATGCTTTGAAAAATATTTTATGTAAGTACATCAAATAACTTATT
TTAAAATACAACAATTGACTACATTTTTAAAACACGTTTATCATTAATTCACAAGACAATAGAGCTAAAA
TACTTACAACCATATTGCAGTTCCTGTATCAAGTTTTATGAAATATTATATTTGCTTTTTATCAAAAAGA
```

4.1.1 Materiales y métodos

4.1.1.1 Muestra

La muestra que se tomará en cuenta son muestras provenientes de carne de cerdo. Para el control positivo se requiere tomar muestras de sangre, así como también se tomarán muestras provenientes de la carne de cerdo hembra y macho procedentes de rastros para confirmar el género de la especie. Posteriormente se adquirirán muestras provenientes de expendios para su identificación así como también de productos cárnicos de cerdo provenientes de tiendas departamentales.

El almacenado de las muestras se hará en recipientes estériles y se congelarán a -10°C.

4.1.1.2 Equipos

- Vórtex
- Incubadora termoblok
- Centrífuga
- Espectrofotómetro Nanodrop

- Cámara de electroforesis
- Balanza digital
- Horno de microondas
- Millipore

4.1.1.3 Materiales

- Tubos Eppendorff
- Matraz Erlenmeyer
- Micropipetas distintas capacidades
- Puntas para micropipetas
- Gradillas

4.1.1.4 Reactivos

- Solución de lisis
- Enzima proteasa
- Fenol-cloroformo alcohol isoamílico
- Etanol frío
- Agua libre de nucleasas
- Agua destilada
- Agarosa
- TAE
- Bromuro de Etidio
- Colorante Blue Orange

4.1.2 Estrategia metodológica

4.1.2.1 Extracción de DNA total a partir de tejido muscular

Disgregación del tejido:

1. Enjuagar el tejido con agua estéril usando guantes para la manipulación.
2. Congelar una porción de tejido (en nitrógeno líquido o congelador normal)
3. Moler el fragmento de carne utilizando un mortero
4. Pesar 0.125 g de carne en un tubo Eppendorff
5. Adicionar 1.25 ml de solución de lisis
6. Agitar con vórtex hasta que se visualicen pedazos más pequeños

7. Adicionar 7 µl de enzima proteasa previamente concentrada a 20 mg/ml
8. Incubar los tubos a 50 °C en termociclador por 2 horas
9. Desactivar la enzima manteniendo la temperatura del termociclador 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 mezcla de fenolcloroformo-alcohol isoamílico
2. Mezclar el tubo varias veces suavemente
3. Centrifugar a 10,000 rpm a temperatura ambiente
4. Separar las fases, recuperar la fase acuosa superior que contiene el DNA. Evitar tocar cualquiera de las otras fases (fenolcloroformo-alcohol isoamílico).
5. Trasladar la fase recuperada a 2 tubos Eppendorff 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 10,000 rpm por 10 minutos
4. Decantar el etanol y dejar secar el DNA en incubadora a 31°C colocando los tubos en forma vertical. El DNA debe visualizarse pegado al tubo con una mancha blanca
5. Una vez eliminado el etanol se adiciona agua desionizada para resuspender DNA agitando suavemente el tubo hasta su completa disolución
6. Cuando la solución presenta partículas insolubles, se reintenta la extracción de proteínas y polisacáridos con fenolcloroformo-alcohol isoamílico y se vuelve a lavar con etanol

4.1.2.2 Cuantificación de DNA por medición de absorbancia a 260 nm

Para cuantificar la cantidad de DNA, las lecturas se toman a 260 y 280 nm. La lectura de 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una unidad de densidad óptica corresponde aproximadamente 50 µg de DNA de doble hebra. La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA tienen valores de 1.8 mientras que valores

de 2.0 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.

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

$$\frac{Ab^s 260}{Ab^s 280} = 1.8 - 1.9$$

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

$$mg/ml = Abs_{260} * \frac{50\ \mu g}{ml} * \frac{vol.final}{vol.inicial} * \frac{1\ ml}{100\ \mu l}$$

Donde:

La concentración está dada en mg/ml y los términos involucran el valor dado de la absorbancia (Abs) a 260nm, la concentración correspondiente a una unidad de absorbancia, la dilución de la solución de DNA y por último, el factor de conversión de ml a µl.

4.1.2.3 Amplificación de DNA

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 mM, mientras que el DNA requiere una concentración relativamente baja puesto que, teóricamente, una sola copia de DNA debería ser suficiente para una adecuada amplificación, sin embargo, la extracción del DNA implica la colecta de millones de cadenas originales.

Preparación de la muestra

1. En un tubo Eppendorff adicionar 12.5 µl de Master mix
2. Adicionar 0.25-2.5 µl del *primer* 1 con concentración de 0.1- 1.0 mM
3. Adicionar 1-5 µl de DNA con concentración <250 ng
4. Adicionar agua libre de nucleasas, la necesaria para completar 25 µl

4.1.2.4 Etapas y ciclos de la reacción

La programación del termociclador se efectúa de acuerdo a las condiciones basadas en las recomendaciones de Promega para la utilización de la mezcla master mix para PCR. La etapa de hibridación se realiza a 57 °C, pues debe coincidir con la Tm 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.

Cálculo de la temperatura media:

$$Tm = 4 (\#G + \#C) + 2 (\#A + \#T)$$

4.1.2.5 Preparación del gel de agarosa

Los componentes de un gel de agarosa adecuado para la electroforesis se mezclan de acuerdo al tamaño de las moléculas de DNA. Para preparar un gel al 2% los componentes se describen a continuación:

Componente	Cantidad
Agarosa	0.3 g
BrEt en concentración 10 mg/ml	1 ml
TAE 1X	30 ml

1. Se cierran las aperturas laterales del soporte del gel.

2. Pesar la agarosa y adicionar el TAE 1X.
3. Se calienta la mezcla en horno de microondas a potencia baja hasta que quede bien disuelta.
4. Se añade BrEt y se mezcla bien.
5. La mezcla se vierte en el soporte cuidando que no se formen burbujas, si se forman es preciso retirarlas.
6. Inmediatamente después se colocan los peines.
7. Se deja solidificar el gel en una zona nivelada y libre de corrientes de aire.
8. Se retiran los peines.
9. Adicionar TAE 1X a la cámara de modo que el gel quede cubierto.
10. Cargar los pocillos con la muestras de DNA.

4.1.2.6 Electroforesis horizontal

1. En un trozo de parafina se sitúan gotas de colorante Blue Orange + muestras + BrEt + marcador de peso molecular, evitando incorporar burbujas.
2. Posteriormente se mezclan las gotas mencionadas en el paso número 1, se recogen con ayuda de una micropipeta y se depositan en el pocillo correspondiente.
3. Cuando se han terminado de cargar los pocillos, se cierra la cámara de electroforesis (Figura 14) y se conecta a la fuente de poder, el cátodo se conecta en el extremo cercano a los pocillos de modo que la película mire hacia el ánodo.
4. La corriente se retira hasta que el colorante se visualice cerca del extremo contrario.

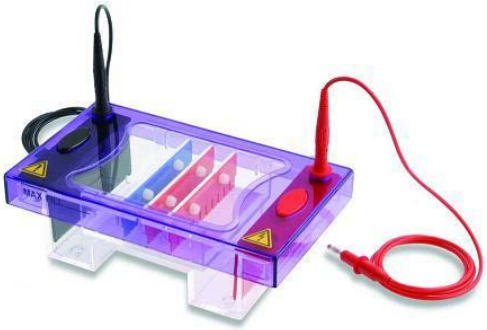


Figura 15 Cámara de electroforesis horizontal (biotech, 2013).

4.1.2.7 Fotodocumentador

Al finalizar la migración electroforética, se retira cuidadosamente el gel de la cámara y se lleva a un fotodocumentador (UVP BioDoc-It) (Figura 15). La visualización se hace con luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm.

Figura 16 Fotodocumentador (Prolab, 2014))

4.2 Discusión

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene variantes, una de las cuales fue utilizada en el estudio para la determinación de género en carne de cerdo y productos cárnicos realizado en 2012 por Abdulmawjood, llamada PCR múltiplex, la cual es una técnica en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción. Se emplean dos o más pares de iniciadores en un tubo de reacción con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN (Edwards, y Gibbs 1995). Dos ó más pares de cebadores son usados al mismo tiempo. Éstos pueden ser diseñados y pueden trabajar por separado, pero cuando se ponen juntos, los cebadores de un par pueden interactuar con los cebadores del otro. Esto hace que la optimización para la PCR multiplex sea difícil, ya que cada cebador puede tener diferentes requerimientos, lo que pone un tanto en desventaja a ésta técnica (Álvarez, 2013).

En este trabajo se propuso una metodología usando PCR convencional o anidada, éste tipo de PCR tiene la ventaja de brindar alta sensibilidad y especificidad. La especificidad aumenta porque como es amplificación de un amplicón obtenido previamente, los cebadores sólo van a hibridar en un sitio dentro de la molécula y el resultado será una única banda, evitando así posibles hibridaciones inespecíficas de los cebadores. Las ventajas de este método son el aumento de la sensibilidad en la detección al obtenerse un mayor número de copias del fragmento amplificado y disminuir la cantidad de ADN molde. Las desventajas, son el requerir más tiempo y materiales, como también el mayor riesgo de contaminación. Esta última desventaja se puede evitar siguiendo las normas preventivas de contaminación para la PCR (Singh *et al.*, 1996).

Compañías de rastro europeas demandan exclusivamente carne de cerdo hembra. Para controlar la calidad de sus proveedores, la identificación del género del animal es por mucho lo más importante para las compañías procesadoras de carne. Es por eso que en Europa se diseñó un método rápido y seguro para la diferenciación de género en carne de cerdo y productos cárnicos mediante la técnica de PCR multiplex. Éste estudio estuvo basado en los genes AMEL-X y AMEL-Y específicos para la identificación de género (Abdulmawjood *et al.,* 2012). Tomando en cuenta este estudio

Debido a lo anterior, se propuso una metodología para la diferenciación de género en carne de cerdo y productos cárnicos, usando PCR convencional o anidada, tomando

como base los “primers” descritos en el trabajo realizado por Abdulmawjood *et al (2012),* y los genes para diferenciación de género proporcionados por el NCBI, así como también se tomó como referencia la metodología descrita por Sambrook, la cual es específica para la PCR anidada. Aplicando la metodología propuesta, se espera poder distinguir carne de cerdo de macho y hembra en los productos que se pretendan analizar en los distintos establecimientos, ya sean productos comerciales, así como también en carne proveniente de expendios. Con esto se puede justificar la aplicación de la técnica de PCR para un rápido análisis para verificar y/o identificar si la carne que consumimos proviene de macho o de hembra. Esto es recomendable aplicar en empresas o industrias que deseen contribuir de alguna manera en el apoyo para reducir el sufrimiento por el que pasan los cerdos machos durante la castración sin anestesia, con el fin de evitar el olor indeseable en la carne característico de los cerdos machos sin castrar. Las asociaciones protectoras de animales se han pronunciado a favor de la exigencia hacia las empresas expendedoras de carne de cerdo, para sólo adquirir y exigir carne de cerdo proveniente de hembras, para evitar que los granjeros y personas dedicadas a ésta industria sigan realizando el proceso de castración sin las medidas adecuadas de bienestar animal. Esto ha resultado en que las empresas, en su necesidad de satisfacer al cliente, sólo acepten carne de cerdo hembra de sus proveedores. Actualmente la vacuna de la inmunocastración ha dado buenos resultados, tanto para el bienestar del animal como para las exigencias de los consumidores preocupados por el trato hacia los animales y la calidad de la carne. Por lo anterior, la carne de cerdo macho, ahora se convierte en un “problema” ya que, debido a la exigencia de los consumidores, pocas empresas la aceptan. Lo que se ha propuesto es que la carne de cerdos machos enteros que no es aceptada por sus atributos organolépticos, sea destinada a la fabricación de embutidos, ya que la carne sólo presenta características de sabor y de olor indeseables, pero es “apta” para el consumo humano, y de ésta manera con éste proceso se enmascara el olor y el sabor debido a los aditivos utilizados en este tipo de industria, no afectando la calidad sensorial de los productos terminados. La relación que hay costo-beneficio de los rastros y lugares donde se practica el procedimiento de castración evita la adquisición de anestesia y personal autorizado, debido a que aumenta los costos de producción y no toma en cuenta el bienestar animal; aunque también llegan a haber pérdidas debido al mal procedimiento o por un entorno de trabajo antihigiénico a la hora de realizar ésta práctica.

CONCLUSIONES

El presente trabajo ha descrito una panorámica de la metodología a seguir para determinar la diferenciación de género en carne de cerdo y productos cárnicos.

En éste trabajo se presentaron alternativas tanto para evitar la castración como para la utilización de la carne de los cerdos machos enteros, aunque en México se debe de realizar un extenso trabajo de información al consumidor sobre las ventajas y desventajas que presenta el consumir carne de cerdo macho entero y/o castrado mediante las diversas técnicas de castración, así como lo es el principal problema que lo ocasiona, que es el bienestar animal. En México la mayoría de las personas desconoce que los cerdos machos se castran para evitar el olor indeseable característico, otras cuantas saben que los cerdos se castran pero desconocen que el animal no es castrado de una manera adecuada. Así que hay que poner especial énfasis en la información y propaganda acerca de estos problemas para que en un futuro pueda haber una exigencia por parte de los consumidores hacia las empresas para sólo consumir carne de cerdo proveniente sólo de hembras e ir erradicando poco a poco las malas prácticas a la hora de la castración.

La detección por PCR para carne de cerdo macho parece ser útil como prueba de diagnóstico de rutina para la detección en carne de cerdo macho y productos cárnicos. En conclusión se debe hacer conciencia en los consumidores sobre la problemática entera para poder cambiar poco a poco la manera en la que las empresas, rastros y toda industria dedicada a la producción de carne de cerdo realizan el procedimiento de castración.

Referencias

- Abdulmawjood, A., Krischek, C., Wicke, M., & Klein, G. (2012). Determination of pig sex in meat and meat products using multiplex real time-PCR. *Meat science*, *91*(3), 272–6.
- Aguilar, A., Alonso, G., & Pesqueros, L. D. P. (2012). Identificación de especies de atún (Thunnus spp) en Venezuela utilizando la técnica de PCR., *XXII*, 368–375.
- Álvarez F., R. (2013). Explanatory chapter: PCR primer design. *Methods in Enzymology*, *529*, 1–21. doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00001-X
- Andrade, F. G. (2006). Ensayos Médicos sobre Genética. La genética molecular en la medicina ecuatoriana. Ed. Noción.
- Arnau J., G. R. A. (2008). La problemática de los machos enteros en el jamón curado. Ed. IRTA.
- Bello, G. J., (2008). Jamón curado: Aspectos científicos y tecnológicos. Ed. Díaz de Santos.
- Berg M J., Stryer L., Tymoczko J L. (2008). Bioquímica. Ed. Reverte.
- Bonneau, M., & Lebret, B. (2010). Production systems and influence on eating quality of pork. *Meat science*, *84*(2), 293–300.
- Costa, E., Gil, M. D., Garrido, M. D., & Ban, S. (2003). A comparative study of boar taint in cooked and dry-cured meat, *63*, 381–388.
- Claus, R., Weiler, U., & Herzog, A. (1994). Physiological Aspects of Androstenone and Skatole Formation in the Boar A Review with Experimental Data, *38*, 289–305.
- Díaz y Mejía, (2007). El mercado de la carne de cerdo en canal en México, Análisis Económico, Vol. XXII, Núm. 51, sin mes, pp. 273-287.
- Edwards M.G, Gibbs R.A (1995). Multiplex PCR. In Dieffenbach Dveksler GS (eds). PCR Iniciador,; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Plainview, N.Y , p 157-171.
- Fajardo M. V., González M. I., et al. (2009). Autenticación de carnes procedentes de especies de caza mayor por técnicas genéticas. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Freifelder D., 1981. Técnicas de bioquímica y biología molecular, volumen 3 serie de Biología Fundamental, Reverte.

- Fontanesi, L., Scotti, E., & Russo, V. (2008). Differences of the porcine amelogenin X and Y chromosome genes (AMELX and AMELY) and their application for sex determination in pigs. *Molecular reproduction and development*, *75*(11), 1662–8.
- Forbes Betty A. (2007). Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana, 12ª ed.
- Fuchs, T., Nathues, H., Koehrmann, A., Andrews, S., Brock, F., Sudhaus, N., Klein, G., et al. (2009). A comparison of the carcase characteristics of pigs immunized with a “gonadotrophin-releasing factor (GnRF)” vaccine against boar taint with physically castrated pigs. *Meat science*, *83*(4), 702–5.
- García, B, J., (2006). Temario Específico de Técnico Especialista de Laboratorio. Ed. MAD-Eduforma, vol 2.
- Harvey Lodish y Arnold Berk. (2005). Biología celular y molecular, Ed. Médica Panamericana, 5ta edición.
- Hernández Chávez Juan Francisco., (2007). Técnicas analíticas para la determinación de la autenticidad de la carne y de los productos cárnicos procesados térmicamente, Vol. 1, No. 2, pp. 97-109
- Langen, M., Peters, U., Körner, U., Gissel, C., Stanislawski, D., & Klein, G. (2010). Semiquantitative detection of male pork tissue in meat and meat products by PCR. *Meat science*, *86*(3), 821–4.
- Mane, B. G., Mendiratta, S. K., & Tiwari, a. K. (2012). Beef specific polymerase chain reaction assay for authentication of meat and meat products. *Food Control*, *28*(2), 246–249.
- Martínez, J. H., Rebollar, S. R., Rubio, R. R., Jiménez, D. C., Salazar, A. G., Soria, E. G., Ángel, M., et al. (2008). Competitividad del comercio exterior. Ciencia Ergo Sum, vol. 15, núm. 2, pp. 126-131
- Mathur, P. K., Ten Napel, J., Bloemhof, S., Heres, L., Knol, E. F., & Mulder, H. a. (2012). A human nose scoring system for boar taint and its relationship with androstenone and skatole. *Meat science*, *91*(4), 414–22.
- Monge Calvo Jorge Danilo. 2005. Producción Porcina. Ed. EUNED,
- Mörlein, D., Grave, A., Sharifi, A. R., Bücking, M., & Wicke, M. (2012). Different scalding techniques do not affect boar taint. *Meat science*, *91*(4), 435–40.
- Rojas M. D., Wolf C., Delso C. (2008). Autentificación de carne y productos cárnicos procedentes de Codorniz, faisán, perdiz y pintada mediante una técnica

de PCR con cebadores especie-específicos. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

- Sabater Sergi Cortés. (2009). Conceptos y técnica en ecología fluvial. Ed. Fundación BBVA.
- Sambrook J., R. D. (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Singh B., Cox-Singht J., Miller AO, Abdullah MS, Snounou G, Rahman HA. (1996). Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. Trans R Soc Trop Med Hyg; 90:519-21
- Tagu D., et al. (2006). *Fundamentos de las técnicas de biología molecular.* Zaragoza: España.
- Tortora J. Gerard, Berdell R. Funke, Christine L. Case., (2007). Introducción a la microbiología. Ed. Médica Panamericana.
- Yuryev Anton. (2009). Physical Principles for PCR Primer Design. *Methods in Molecular Biology*. Aridne Genomics Inc.
- Zavala C J E. (2005). Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular. Ed. UADY.
- Biotech (2013). http://www.biotech-sl.com
- Comecarne (Consejo Mexicano de la carne) (2011). http://www.comecarne.org/documentos-pdf/
- Condalab (2010). http://www.condalab.com/pdf/FAQ_agarosas.pdf
- FAO (2013). http://www.fao.org/
- Microbial (2009). http://www.microbialystems.com/web/docs/Newsletter_Microbial_03.pdf
- Pfizer (2010). https://animalhealth.pfizer.com/sites/pahweb/MX/ES/Productos/Paginas/Improvac.aspx
- Prolab (2013). http://www.pro-lab.com
- SAGARPA (2011). http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/estudios_economicos/escenariobase/perspectivalp_11-20.pdf
- UNAM (2009). http://www.ibt.unam.mx/