



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Determinar la presencia de carne de perro (*Canis lupus familiaris*) por PCR en productos cárnicos populares que se expenden en la vía pública”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

CRUZ GARCÍA ADRIANA

ASESOR: DR. JOSE FRANCISCO MONTIEL SOSA

COASESOR: M. en C. ANA ELVIA SÁNCHEZ MENDOZA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
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 comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Determinar la presencia de carne de perro (*Canis lupus familiaris*) por PCR en productos cárnicos populares que se expenden en la vía pública.

Que presenta la pasante: Adriana Cruz García
Con número de cuenta: 410019036 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. Adriana Llorente Bousquets	
SECRETARIO	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
1er. SUPLENTE	I.A. María Guadalupe López Franco	
2do. SUPLENTE	I.A. Miriam Álvarez Velasco	

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

IHM/mmgm*

DEDICATORIAS

A mis padres Juan Cruz y Cayetana García, gracias por haberme dado el gran regalo de la vida, por todo el esfuerzo que han hecho para que yo pueda formarme profesionalmente, por todo el amor y tiempo dedicado a mi educación, por las palabras de ánimo cuando sentía que ya no podía más, por los besos y abrazos para impulsarme a seguir adelante, gracias por caminar a mi lado y acompañarme en esta gran aventura llamada vida, los amo con todo mi corazón.

A mi hermano Fredy, por ser mi gran apoyo, por todos los consejos, enseñanzas, aprendizajes, por ser tu hermanita consentida, por cuidarme desde pequeña hasta ahora☺.

A mi hermano Juan, la distancia no impide que el cariño crezca y se fortalezca, gracias por tus palabras de ánimo y por alentarme a siempre a ser mejor.

A mi hermana Claudia, mi compañera de juegos y confidente, por todo el apoyo que me has brindado y por escucharme cada vez que las cosas iban mal.

A mis hijos sobrinos Bryan, Emmanuel, Noemí, Natalia, Brandon y María José, por regalarme sonrisas y recordarme con sus ocurrencias la alegría de ser niño.

A mi compañero de vida Tony, no hay palabras para agradecer la dicha que me regalas día con día, gracias por llegar a revolucionar mi vida y darle sentido, por el gran apoyo que me brindas y por no dejar que mi espíritu decaiga, por darme la mano y ayudarme a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis Dr. José Francisco Montiel Sosa por brindarme la oportunidad y confianza de llevar a cabo mi proyecto, por los consejos y experiencia compartida en cada una de las clases y asesorías.

A mi coasesora de tesis la M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza, por el tiempo dedicado para que pudiera llevar a cabo satisfactoriamente el desarrollo experimental de mi proyecto, por los consejos y sobre todo por su infinita paciencia.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara por los consejos y apoyo brindado en el laboratorio y por las palabras de ánimo para concluir mis objetivos.

A la M. en C. Karla Mariana García Banda, por transmitir conocimientos y experiencia durante el desarrollo de la fase teórica del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio (Laura, Bety, Arturo, José Luis, Gaby, Ivan) por hacer más amenos los largos días de experimentación, por la ayuda mutua, anécdotas compartidas y ser partícipes de los logros obtenidos en las pruebas realizadas en cada uno de nuestros proyectos.

A mis compañeros de generación 34, ya que en el transcurso de la carrera compartimos gran parte de nuestras vidas para lograr una meta en común, el formarnos como profesionistas, orgullosamente Ing. en Alimentos.

Y principalmente gracias a la UNAM a la FES Cuautitlán Campo 1, por darme la oportunidad de formar parte de esta gran institución, por los recursos e instalaciones brindadas y sobre todo por alimentar mis sueños e ideales de aportar algo bueno a nuestra sociedad, con la mentalidad de que “Por mi raza hablará mi espíritu”

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
GLOSARIO	ix
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	3
1.1. Definición de carne	3
1.2. Fuentes de obtención de la carne.....	3
1.2.1. Vaca	3
1.2.2. Ternera.....	3
1.2.3. Vacuno joven	3
1.2.4. Cerdos	3
1.2.5. Caprino.....	4
1.2.6. Ovino	4
1.2.7. Aves	4
1.3. Macro constituyentes del tejido muscular.....	5
1.3.1. Proteínas.....	5
1.3.2. Lípidos	6
1.4. Calidad de la Carne	6
1.4.1. Identificación visual.....	7
1.4.2. Olor	8
1.4.3. Firmeza	8
1.4.4. Jugosidad	8
1.4.5. Terneza.....	8
1.4.6. Sabor	9
1.5. Características de las especies de interés.....	9
1.5.1. Carne de bovino (<i>Bos taurus</i>)	9
1.5.2. Carne de porcino (<i>Sus scrofa domestica</i>)	12
1.5.3. Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>).....	14

1.6. Técnicas para detectar adulteraciones en alimentos.....	16
1.6.1. Definición de alimento adulterado.....	16
1.6.2. Tipos de adulteración.....	16
1.6.3. Técnicas inmunoenzimáticas.....	16
1.6.4. Técnicas de Biología Molecular.....	17
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	24
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	24
2.2 CUADRO METODOLÓGICO.....	25
2.2.1. Problema.....	26
2.2.2. Objetivo General.....	26
2.2.3. Objetivos particulares.....	26
2.3. Material.....	27
2.3.1. Reactivos biológicos.....	27
2.3.2. Reactivos químicos.....	28
2.3.3. Equipo de laboratorio.....	28
2.4. Métodos.....	29
2.4.1. Extracción de ADN total de las muestras de cada especie.....	29
2.4.2. Cuantificación de ADN por nanoespectrofotometría.....	30
2.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	30
2.4.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	33
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS.....	52
ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de las piezas de vacuno	10
Cuadro 2. Relación entre concentración de agarosa en el gel entre la eficiencia en el rango de separación de las moléculas de ADN	23
Cuadro 3. Primers que se utilizan para la PCR con secuencia de 5' a 3' y tamaño de amplificado.....	31
Cuadro 4. Componentes de la PCR.....	31
Cuadro 5. Cuantificación de muestras de ADN de Cerdo, Bovino y Perro sin diluir.....	36
Cuadro 6. Cuantificación de muestras de ADN de Cerdo, Bovino y Perro diluidas.	36
Cuadro 7. Cuantificación de ADN de muestras comerciales de carne procesada para tacos de suadero y bovino sin diluir	42
Cuadro 8. Cuantificación de ADN de muestras comerciales de carne procesada para tacos de suadero y bovino diluidas.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Triangulo de color para carne fresca	7
Figura 2. Piezas principales del vacuno	10
Figura 3. Razas utilizadas para la obtención de carne en México	11
Figura 4. Producción Nacional en toneladas de carne en canal de Bovino.....	12
Figura 5. Principales piezas de carne de porcino	13
Figura 6. Producción Nacional de carne en canal de Porcino en porcentaje	14
Figura 7. Rasgos anatómicos del perro	15
Figura 8. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa: a) Mezcla de los componentes de la reacción, b) Desnaturalización, c) Hibridación y d) Elongación.....	21
Figura 9. Esquema de la migración de las moléculas de ADN lineales de doble cadena en geles de agarosa, las moléculas se separan de acuerdo al tamaño molecular	23
Figura 10. Etapas y condiciones de la PCR para perro	32
Figura 11. Etapas y condiciones de la PCR de las especies cerdo y bovino.....	32
Figura 12. Materiales básicos para realizar una electroforesis en gel de agarosa y como se distribuyen para hacer el gel de agarosa.	34
Figura 13. Secuencias de nucleótidos de los primers en el gen del citocromo b. SIM) Primer frontal universal para las especies de cerdo y bovino, G) Primer reverso específico para bovino y P) Primer reverso específico para cerdo.	37
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 60 V para evaluación de la especificidad de los primers de cerdo.	39
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 60 V para evaluación de la especificidad de los primers de bovino.	40
Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida a 70 V para evaluación de la especificidad de los primers de perro.....	41
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 60 V para evaluación de las muestras de carne de los productos populares para detectar la presencia de Cerdo.	44
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 60 V para prueba de detección de bovino en muestras de productos populares de carne de suadero y al pastor.	45

Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida a 70 V para prueba de detección de perro en muestras de productos cocidos populares mexicanos de carne al pastor.	46
Figura 20. Electroforesis en gel poliacrilamida a 70 V para prueba de detección de perro en muestras de productos cocidos populares mexicanos de carne de suadero.	47
Figura 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida a 70 V para prueba de sensibilidad evaluando diferentes concentraciones de carne de perro en mezcla con carne de cerdo.....	48

GLOSARIO

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.
Amplificado	Producto de la PCR, consiste en fragmentos específicos de ADN delimitados por los primers.
ARN	Ácido ribonucleico.
BrEt	Bromuro de etidio.
dNTP's	Desoxirribonucleotidos.
Gen	Unidad de información dentro del genoma, que contiene todos los elementos necesarios para su expresión de manera regulada.
Genoma	Conjunto de genes contenidos en los cromosomas, totalidad de la información genética que posee un organismo o una especie en particular.
pb	Pares de bases
PCR	“Polymerase Chain Reaction”, Reacción en Cadena de la Polimerasa.
Primers	Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN.
Secuencia	Composición de nucleótidos de los primers.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo detectar la posible presencia de carne de perro en productos cárnicos populares que se expenden en la vía pública, esto se realizó mediante la aplicación de la técnica de biología molecular denominada reacción en cadena de la polimerasa. En México las especies permitidas para consumo son: bovino, cerdo, carne de aves y pescado. La probabilidad de que se encuentre carne de otras fuentes es baja ya que en México existe gran diversidad de especies de mamíferos que se pueden consumir legalmente aunque es importante considerarlo ya que esto constituye una adulteración de acuerdo con la normatividad mexicana y en otras partes del mundo si se consume la carne de otras especies, principalmente en Asia.

A lo largo del desarrollo del proyecto se obtuvieron muestras en diferentes puntos del Estado de México que fueron Coacalco de Berriozábal, Ecatepec, Cuautitlán Izcalli y Tultitlán; también del Distrito Federal, las cuales se adquirieron en alrededores de las estaciones del metro Indios Verdes, La Raza, Tepito, Guerrero y Chapultepec. De todas las muestras colectadas se hizo la extracción de ADN, el cual se obtuvo en concentraciones altas a pesar de que ya habían sido tratadas térmicamente, después con los ADN extraídos se comprobó la especificidad de los primers de las especies de Cerdo, Bovino y Perro para asegurar de que solo amplificaran para estas especies teniendo resultados positivos que indicaban la especificidad de la prueba. Ya teniendo la certeza de que el ADN y los primers funcionaban bien con los programas seleccionados de bibliografía convencional, se procedió a efectuar la reacción en cadena de la polimerasa concluyendo que en ninguna de las 10 muestras (5 muestras de suadero y 5 muestras de carne al pastor) se encontró la presencia de carne de perro, dejando el precedente de que en estudios posteriores se puedan utilizar estos primers con muestras de alimentos locales o estatales en el país en diferentes puntos del País o bien a nivel mundial. Por último con el propósito de conocer cuál es la capacidad de detección de los primers de perro, se realizó una prueba de sensibilidad para determinar hasta qué porcentaje de ADN de perro en combinación con ADN de cerdo es posible detectar este tipo de adulteración, para ello se hicieron mezclas de carne de perro y cerdo a diferentes porcentajes, siendo la mezcla de 10% perro y 90% cerdo la que permitió la detección mínima utilizando los primers específicos para su evaluación por PCR.

INTRODUCCIÓN

La carne es una fuente primaria de proteína de buena calidad, contiene entre 20% y 35% que proporciona los aminoácidos esenciales (lisina, treonina, metionina, fenilalanina, triptófano, leucina, isoleucina y valina), así como una buena cantidad de micronutrientes (de acuerdo a los requerimientos nutricionales del ser humano) (Aida *et al.*, 2005).

La adulteración de los alimentos cárnicos es una problemática actual, su objetivo básicamente es sustituir materias primas o compuestos originales por otros similares, pero más baratos y de menor calidad, esto es ilegal y se hace con el propósito de lograr mayores ganancias por parte de productores o vendedores de materias primas a expensas del bolsillo de los consumidores, y no en pocas ocasiones poniendo en riesgo su salud. La identificación del origen de los alimentos ha recibido gran atención, no sólo desde el punto de vista económico, sino también legal, de salud y las razones éticas para proteger al consumidor (Mondragón., 2011; Mane y col., 2011; Lago y col., 2011).

Es por esta problemática que en la actualidad es necesario emplear técnicas específicas y sensibles para la autenticación de especies en los productos comerciales, como el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para detectar la presencia de carne no aprobada para consumo humano, ya que es la técnica más específica y sensible debido al uso del ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN mitocondrial (ADNmt) facilita la amplificación por PCR en el caso donde la disponibilidad del ADN molde, después de su extracción de las células, es insuficiente para la detección; el ADNmt es varias veces más abundante que el del genoma nuclear, además de que evoluciona mucho más rápido y presenta más diversidad de secuencias, facilitando así la identificación de especies estrechamente relacionadas (Ulca y col., 2013; Chandrika y col., 2009).

La sustitución deliberada de una especie de carne por una más barata está en constante incremento, es por ello que el objetivo del trabajo es la identificación de la presencia de carne de perro en productos cárnicos cocidos populares mexicanos elaborados con cerdo y bovino empleando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, para amplificar los fragmentos de ADNmt a través de primers específicos de cada especie y que permitan diferenciar las especies de interés.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. Definición de carne

Estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos; proveniente de los animales para abasto, que no ha sido sometida a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas; se incluyen las refrigeradas o congeladas (NOM-194-SSA1-2004).

1.2. Fuentes de obtención de la carne

1.2.1. Vaca

Procede de animales al final de su periodo útil de producción de leche, normalmente de una edad de 5-8 años en el momento del sacrificio, cuando el rendimiento lácteo comienza a disminuir (Ranken, 2003).

1.2.2. Ternera

La producción de leche es una secuela del parto; los terneros machos y muchas de las hembras son un exceso para los requerimientos del nuevo vacuno de leche. El exceso proporciona carne de terneras que crecen hasta los 3-4 meses de edad (Ranken, 2003).

1.2.3. Vacuno joven

Son los machos crecidos hasta los pesos de producción de carne (450 kg de peso vivo o más); habitualmente no están disponibles para la elaboración, excepto en las grandes industrias cárnicas, donde se suministra recortes (Ranken, 2003).

1.2.4. Cerdos

El cerdo o porcino, se cría en casi todo el mundo, principalmente como fuente de alimento, por su alto valor alimenticio, alto en proteínas y por su exquisito sabor. Del cerdo se aprovechan el cuero (piel de cerdo) para hacer maletas, calzado y guantes, e incluso en México, ésta es consumida en forma de chicharrón (piel frita); las cerdas de la piel del animal, se utilizan para confeccionar cepillos. Son también fuente primaria de grasa comestible, aunque, en la actualidad, se prefieren las razas que producen carne magra. Además, proporcionan materia prima para la elaboración de embutidos como el jamón, salchichas y chorizo (Financiera Rural, 2012).

1.2.4.1. Cerdos de tocino

Producidos para conseguir dorsos largos con cobertura de grasa desde baja a moderada. Se dedican preferentemente a la producción de tocino (Ranken, 2003).

1.2.4.2. Cerdos pesados

Más grasos y proporcionalmente más cortos. Criados para una tasa de crecimiento alta, a base de una buena conversión del pienso. Se utilizan para una industrialización mixta: carne fresca de cerdo, parte de tocino, parte de embutidos y productos cárnicos (Ranken, 2003).

1.2.5. Caprino

Son buenas productoras de carne y leche. Se estima que el 1.5% de la producción mundial de carne es de origen caprino (Ranken, 2003).

El consumo de cabras tiene una gran variedad de formas, la más importante es la del cabrito que es la base económica de las unidades de producción caprina debido a su precio, el cual se califica debido a su peso y cantidad de grasa: Supremo (9 a 12 kg), Bueno (7 a 8 kg), Regular (5 a 7 kg) y Pobre (menos de 5 kg) (Financiera Rural, 2012).

1.2.6. Ovino

Son animales mamíferos, rumiantes, artiodáctilos, ungulados y herbívoros, generalmente tienen solo una o dos crías por parto. Se alimentan principalmente de pastos y leguminosas. Estos animales llegan a vivir de 8 a 10 años. Los ovinos se clasifican de acuerdo a su propósito; carne, lana y leche; hay algunas con doble propósito carne y lana.

Razas: Existen más de 800 tipos en el mundo, en hábitats diversos. En México, entre las principales razas producidas se encuentran:

- Dorset, Suffolk y Pelibuey **para la producción de carne**
- Debouillet, Rambouillet y Merino Australiano **para producción de lana fina.**
- Lincoln **para la producción de lana larga**
- Romney Marsh y Corriedale **para doble propósito** (Financiera Rural, 2009).

1.2.7. Aves

1.2.7.1 Pollos

Gallinas de producción de huevos (gallonas “agotadas”). Normalmente de 18 meses de edad, pequeñas y con relativamente pobre conformación y rendimiento en carnes. Son baratas y constituyen la principal producción del pollo de engorda (Ranken, 2003).

El pollo de engorda (*Gallus gallus*) es aquel que se cría o produce para aprovechar su carne. Estas aves pueden vivir en granjas bien acondicionadas o en traspatios de casas, y se adaptan a climas templados y cálidos. Las razas más empleadas para la producción de pollos de engorda en nuestro país son: Arbor Acres, Aviam Farm, Hybro, Hubbard, Indian River, Paterson, Ross, Shaver Star-Bro, Isa Vedette, Cob, entre otras. Todas ellas son razas producidas en E.U., Canadá, Francia, Inglaterra y otros países, ya que en México no se cuenta con investigación genética, por resultar excesivamente costosa su instrumentación (Financiera Rural, 2012).

1.2.7.2. Guajolote o Pavo

Para la venta doméstica, las canales varían de 2 a 3 kg de peso. Para la industrialización, se utilizan principalmente los machos; estos tienen normalmente 10-15 kg de peso canal (Ranken, 2003).

El guajolote o pavo es una de las aves domésticas de mayor tamaño, alcanza entre 14 y 18 kg de peso a los 6 meses de edad. Los guajolotes tienen en la cabeza un apéndice carnoso llamado comúnmente "moco", de mayor tamaño en el macho. La cabeza y el cuello son de color blanco azulado cubiertos de pliegues y verrugas de color rojo llamados corales o carúnculas. En el pecho, los machos tienen un mechón de cerdas de color negro llamado escobeta. El color de la pluma del guajolote depende de la raza, por lo que pueden ser de color blanco, bronceado, negro o canela, aunque los más comunes son el blanco y el bronceado (Financiera Rural, 2012).

1.3. Macro constituyentes del tejido muscular.

1.3.1. Proteínas

Según su origen, las proteínas del músculo se clasifican en sarcoplásmicas, miofibrilares y del tejido conectivo, de las cuales la mioglobina, la actina-miosina y el colágeno, entre otras, son las más importantes en relación a la estructura y calidad de la carne así como para su transformación industrial (Esain E. J, 1973).

1.3.1.1. Proteínas sarcoplásmicas

Son solubles en agua o en soluciones amortiguadoras de baja fuerza iónica. A este grupo pertenecen dos tipos principales de proteínas: el primero compuesto de enzimas, y el segundo de sustancias que participan en el color de la carne como la mioglobina y pequeñas

cantidades de hemoglobina, dado que esta se elimina, en su mayoría, durante el desangrado (Hernández *et al.*, 1999).

1.3.1.2. Proteínas miofibrilares

Necesitan para su extracción el uso de soluciones amortiguadoras de fuerza iónica media o alta; son los más abundantes, constituyendo el 65-75% del total de las proteínas musculares. En este grupo se incluyen un gran número de proteínas asociadas con los filamentos gruesos y delgados del tejido muscular, destacando la actina, miosina, actomiosina, troponina, actininas, actomiosina, tropomiosina, actininas, proteína C y M (Hernández *et al.*, 1999).

1.3.1.3. Proteínas insolubles o del estroma

Constituyen las fibras extracelulares de colágeno, elastina y reticulina que, a su vez, forman parte del tejido conectivo típico que recubre las fibras y haces musculares (Hernández *et al.*, 1999).

1.3.2. Lípidos

La grasa se acumula principalmente en cuatro depósitos: cavidad corporal, zona subcutánea y la localizada inter e intramuscularmente. La grasa animal está compuesta de distintos tipos de lípidos, aunque predominan los lípidos neutros, principalmente en forma de triglicéridos, en los depósitos de tejido adiposo y asociados a los septos de tejido conectivo laxo, también se encuentra el colesterol y sus ésteres, mono y diglicéridos, todos ellos en menor concentración que los triglicéridos (Hernández *et al.*, 1999).

1.4. Calidad de la Carne

Cuando se hace referencia a la calidad de la carne, inmediatamente se piensa en variables como suavidad, color, jugosidad, sabor, aroma y vida útil. Entre los atributos que más influyen en la satisfacción del consumidor destacan la suavidad de la carne (terneza), la jugosidad y el sabor de la carne cocida. Todas estas características se logran durante el proceso de producción al buscar ajustarse a las expectativas del consumidor final. Este proceso va desde la engorda del ganado hasta la comercialización de los productos obtenidos en la forma en que el consumidor los requiera (León, 2012).

1.4.1. Identificación visual

La identificación visual de la carne de calidad se basa en su color, veteado y capacidad de retención de agua. El veteado consiste en pequeñas vetas de grasa intramuscular visibles en el corte de carne. El veteado tiene un efecto positivo en la jugosidad y el sabor de la carne. La carne debe presentar un color normal y uniforme a lo largo de todo el corte. Las carnes de vacuno, cordero y cerdo deberían además estar veteadas (FAO, 2012).

El color de la carne es uno de los factores que más afectan la decisión de compra. Depende de la especie animal, la genética (raza), edad, condiciones de faenado y de almacenamiento. La carne debe presentar un color normal (de rosa a rojo cerezo, no blanco ni oscuro), característico y uniforme a lo largo de todo el corte. Cambios de morado a rojo y café son reacciones típicas de la carne (Figura 1).

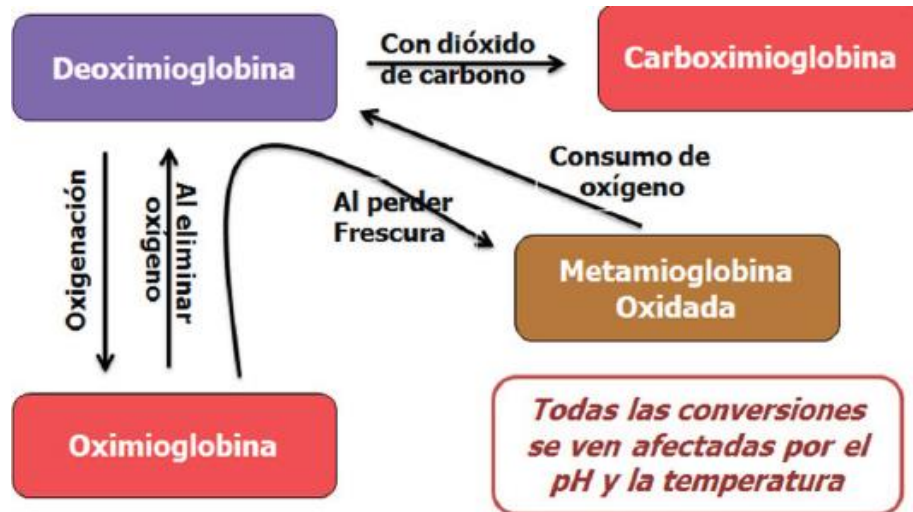


Figura 1. Triángulo de color para carne fresca

(INIFAP, 2012)

Las superficies de carne fresca que han estado en contacto con el aire se tornan de color morado a un color rojo brillante debido al oxígeno del aire. Por otro lado, en ausencia de oxígeno las superficies se mantienen moradas; en cuanto al color café, éste va apareciendo a lo largo del tiempo en condiciones de baja concentración de oxígeno y presencia de metales. Se puede retrasar la aparición del color café con bajas temperaturas. La carne que perdió frescura, no muestra el rojo brillante aunque esté expuesta al oxígeno, ya que la

mioglobina se empieza a descomponer, lo que resulta en coloraciones grisáceas, cafés o verdosas cuando se acompaña de crecimiento microbiano (INIFAP, 2012).

1.4.2. Olor

Otro factor indicador de calidad es el olor. El producto debe tener un olor normal, que diferirá según la especie (p.ej., vacuno, cerdo, pollo), pero que variará sólo ligeramente de una especie a otra. Deberá evitarse la carne que desprenda cualquier tipo de olor rancio o extraño; la carne en descomposición genera un aroma desagradable debido a las sustancias que se originan por la degradación bacteriana (FAO, 2012; INIFAP, 2012).

1.4.3. Firmeza

La carne debe parecer más firme que blanda. Cuando se maneja el envase para uso y distribución al por menor, debe tener una consistencia firme pero no dura. Debe ceder a la presión, pero no estar blanda (FAO, 2012).

La carne debe sentirse más firme que blanda, pero no dura; es decir que debe ceder a la presión por el dedo, pero no estar demasiado suave. Esta característica depende de la edad y sexo del animal, del tipo de corte, tipo de músculo y del tiempo de acondicionamiento en refrigeración que se le haya dado a la canal después del sacrificio (hasta 14 días a 0 a 4°C, hará que aumente la suavidad) (INIFAP, 2012).

1.4.4. Jugosidad

La jugosidad es una característica deseable de la carne ya que incrementa su sabor, contribuye a su blandura, hace que sea más fácil de masticar y estimula la producción de saliva. La jugosidad depende de la cantidad de agua retenida por un producto cárnico cocinado. La jugosidad incrementa el sabor, contribuye a la blandura de la carne haciendo que sea más fácil de masticar, y estimula la producción de saliva. La retención de agua y el contenido de lípidos determinan la jugosidad. El veteado y la grasa presente en los bordes ayudan a retener el agua. Las pérdidas de agua se deben a la evaporación y goteo. El envejecimiento *post-mortem* de la carne puede incrementar la retención de agua y, en consecuencia, aumentar la jugosidad (FAO, 2012; INIFAP, 2012).

1.4.5. Terneza

Está relacionada con diversos factores como la edad y el sexo del animal o la posición de los músculos. Un factor que incide positivamente en la terneza de la carne es el

envejecimiento *post-mortem*. Las canales se envejecen almacenándolas a temperaturas de refrigeración durante un cierto período de tiempo después de la matanza y el enfriamiento inicial (FAO, 2012).

1.4.6. Sabor

El sabor y el aroma se conjugan para producir la sensación que el consumidor experimenta al comer. Esta sensación proviene del olor que penetra a través de la nariz y del gusto salado, dulce, agrio y amargo que se percibe en la boca. En el sabor de la carne incide el tipo de especie animal, dieta, método de cocción y método de preservación (p.ej., ahumado o curado) (FAO, 2012).

1.5. Características de las especies de interés

1.5.1. Carne de bovino (*Bos taurus*)

La carne de bovino forma parte de la dieta integral alimenticia del mexicano, esto es principalmente por el alto valor nutricional que representa. Ésta es obtenida de los bovinos o bóvidos (*Bos taurus*, *Bos indicus*), que son animales vertebrados, mamíferos y ungulados (Financiera Rural, 2012; SAGARPA, 2014).

La carne es uno de los alimentos más nutritivos y apetecidos por el hombre; es una excelente fuente de proteínas de gran calidad, minerales y vitaminas del complejo B. La carne está constituida por un 75% de agua, casi el 20 % de su peso son proteínas; la grasa varía según los cortes y grado de cebamiento del animal en los siguientes rangos: 5-7% en carnes magras, 10-15% para las carnes con poca grasa y 15-25% para las muy grasosas (Blandino J., 2005).

Los factores que determinan la calidad de la carne están dados por:

- * Las características organolépticas o sensoriales (color, terneza, jugosidad, marmóreo) influenciadas por la edad del sacrificio;
- * el valor nutricional (proteínas de alta calidad, bajos niveles de grasa, adecuado perfil de ácidos grasos) asociado con la genética y la alimentación;
- * las condiciones higiénico-sanitarias (libre de *Salmonella*, *E. Coli*, *Listeria*, hormonas, pesticidas, antibióticos, metales pesados) (Corpoica, 2002).

1.5.1.1 Principales piezas de la carne de bovino

Las piezas principales de vacuno, se suministran por lo general para la elaboración de productos. Pertenecen principalmente al cuarto anterior (agujas, pescuezo, espaldilla y morcillo) o cuarto de “pistola delantero” (cuarto anterior, pecho y parte de falda) como se muestra en la Figura 2 (Ranken, 2003).

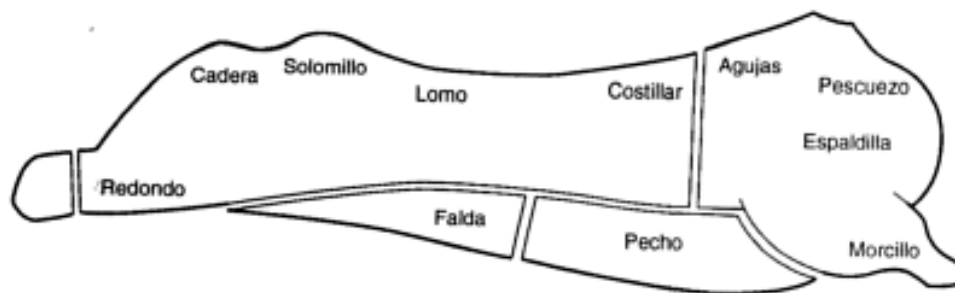


Figura 2. Piezas principales del vacuno
(Ranken, 2003)

La composición química (Cuadro 1) varía dependiendo de la parte del cuerpo del animal de la cual se habla.

Cuadro 1. Composición química de las piezas de vacuno

	Aproximadamente %			
	Músculo	Grasa	Tejido conectivo	Huesos
Redondo	59	5	11	15
Pecho	48	18	17	17
Pescuezo	48	8	19	25
Falda	58	17	25	0

(Ranken, 2003)

1.5.1.2. Principales razas de bovino producidas en México

En la Figura 3 se muestra la variedad de razas utilizadas para la obtención de carne, aproximadamente 30 en nuestro país, entre las más importantes se encuentran las siguientes: Hereford, Charolais, Brahman, Nelore, Pardo Suizo Europeo, Indobrasil, Gir, Beefmaster, Simmental, Limousin, Bragus, Angus, entre otras (Financiera Rural, 2012).



Figura 3. Razas utilizadas para la obtención de carne en México
(Financiera Rural, 2012)

1.5.1.3. Producción de carne de Bovino en México

En la Figura 4 se observa que el volumen de producción es mayor en los estados de Veracruz y Jalisco. Aproximadamente el 60% de la carne producida en el país se comercializa en forma de canal caliente, lo que afecta la calidad e inocuidad para el consumidor. La distribución de la carne ya sea en medias canales o cortes primarios, se efectúa principalmente por intermediarios (mayoristas o tablajeros) que adquieren su mercancía en rastros municipales o clandestinos y en menor proporción, a través de las cadenas de tiendas de autoservicio que son abastecidas por plantas Tipo Inspección Federal (TIF) (Financiera Rural, 2012).

La existencia aproximada de ganado bovino es de 30 millones de cabezas. Entre 8 y 9 millones son sacrificadas anualmente para la producción de carne. Cada una con un peso que en promedio se encuentra en 205 kg por cabeza (Financiera Rural, 2012).

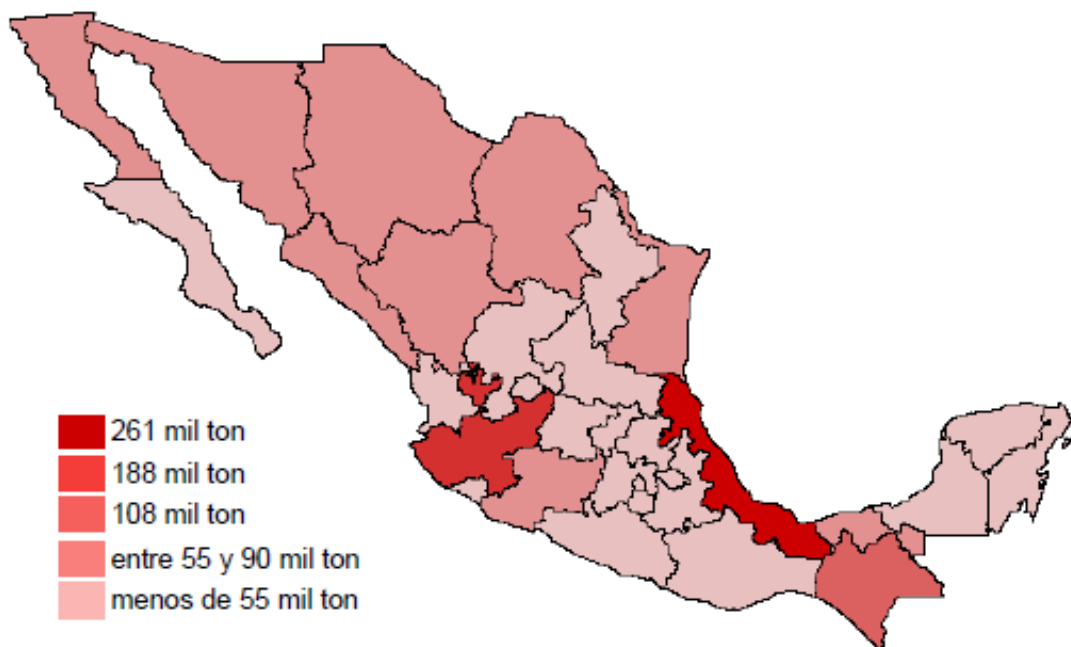


Figura 4. Producción Nacional en toneladas de carne en canal de Bovino
(Financiera Rural, 2012)

1.5.2. Carne de porcino (*Sus scrofa domestica*)

La carne de cerdo debe ser consistente, seca y roja. No es deseable en ningún caso la palidez (degeneración muscular). Para la venta en fresco no es apropiada tampoco la carne de coloración oscura, la cual se prefiere, sin embargo, para la elaboración de productos cárnicos crudos (Danilo, 1998).

Es una fuente de proteína de gran calidad, vitaminas del grupo B y elementos vestigiales. La proteína de carne de cerdo presenta un equilibrio adecuado de aminoácidos para permitir un buen desarrollo. Incluida en la alimentación, aunque sea en poca cantidad y en una ración en que predominen los alimentos vegetales, puede mejorar apreciablemente la calidad de la proteína ingerida; también constituye una fuente notable de algunos elementos minerales, aunque es deficiente en otros. Es rica en fósforo, potasio, hierro, zinc, manganeso y magnesio. Carece totalmente de calcio y es pobre en sodio (Danilo, 1998).

El contenido de vitaminas solubles es mucho; esta carne es rica en tiamina (100 g de lomo de cerdo proporciona el 70% de la tiamina que se requiere diariamente); también suministra vitaminas como riboflavina y la niacina (Danilo, 1998).

La carne de cerdo contiene una proporción relativamente alta de grasa, en comparación con la mayoría de los alimentos. Es más rica en ácidos grasos insaturados que la carne de ganado vacuno y que la leche, y contiene menos colesterol que la mantequilla, los huevos y algunos productos marinos (Danilo, 1998).

Las proporciones de cenizas, proteína, agua y grasa de la carne están reguladas por la genética, así como por factores ambientales. Las de grasa y agua varían en la canal, en relación inversa, de modo que según avanza el engorde animal, desciende su contenido de agua. Los porcentajes de proteína y cenizas permanecen casi constantes, aunque tienden a disminuir ligeramente en los animales cebados (Danilo, 1998).

En características tales como blandura, jugosidad, color, aroma y sabor, la carne porcina es menos variable que la vacuna, ya que las diferencias por edad, raza y ambiente influyen relativamente poco en la calidad de aquella (Danilo, 1998).

1.5.2.1. Principales piezas de carne de porcino

Es importante tener en cuenta la forma en que se va a cortar el animal, en relación a las características estructurales de cada una de las piezas (Figura 5), por ejemplo, la panceta o falda donde no hay huesos (por tanto duras); son también capas más o menos gruesas de grasa entre los músculos, por tanto, tiene características diferentes (Ranken, 2003).

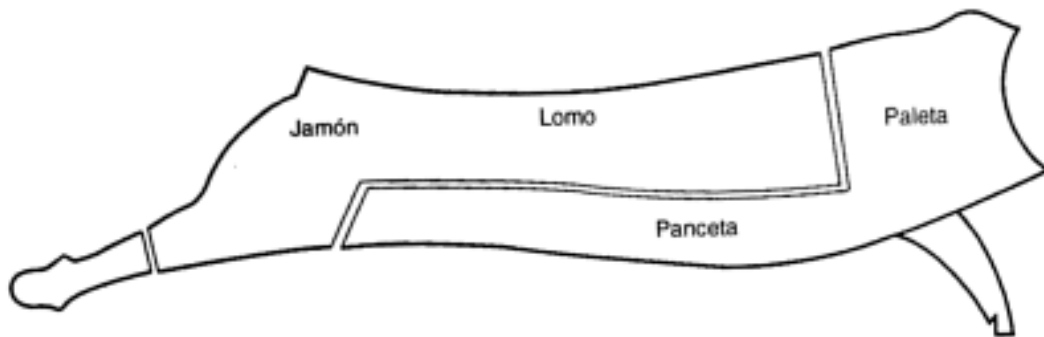


Figura 5. Principales piezas de carne de porcino

(Ranken, 2003)

1.5.2.2. Producción de carne en canal de Porcino en México

La producción de carne de porcino en canal se concentra prácticamente en dos estados de la República: Jalisco y Sonora como se observa en la Figura 6, que tienen una participación en la producción nacional de 18.9% y 18.2%, respectivamente. El primer estado abastece al

mercado nacional, mientras que el segundo orienta su producción principalmente hacia la exportación. Entre otras entidades sobresalientes encontramos a Guanajuato (9.4%), Puebla (9.3%) y Yucatán (8.4%). El 35.8% restante de la producción la conforman los demás estados del país (Financiera Rural, 2012).

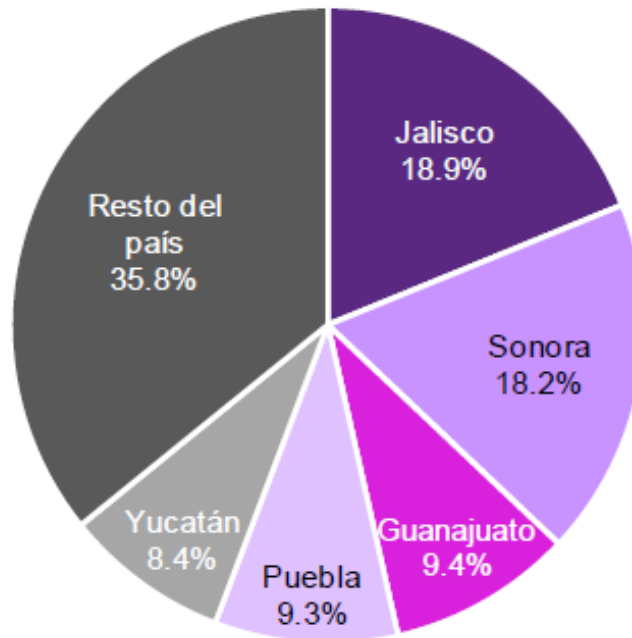


Figura 6. Producción Nacional de carne en canal de Porcino en porcentaje
(Financiera Rural, 2012)

1.5.3. Perro (*Canis lupus familiaris*)

Los perros modernos evolucionaron a partir del lobo gris *Canis lupus*, y la evidencia actual sugiere un origen único en Asia (Savolainen *et al.*, 2002). Es el carnívoro más común en el mundo y se sabe que interactúan con la vida silvestre como depredadores, presas, competidores y reservorios de enfermedades o vectores (Tamim, 2009).

Como resultado de estos cambios morfológicos, los perros son capaces de consumir y sobrevivir en una amplia gama de tipos de alimentos, de basura humana derivado de presas mamíferas que pueden ser una masa corporal varias veces (animales destinados para consumo humano). Sin embargo, el comportamiento socio-ecológico y la dieta de los perros varían con su dependencia de los seres humanos, y esto a su vez afecta a sus interacciones competitivas con los carnívoros silvestres (Botaini *et al.*, 1995).

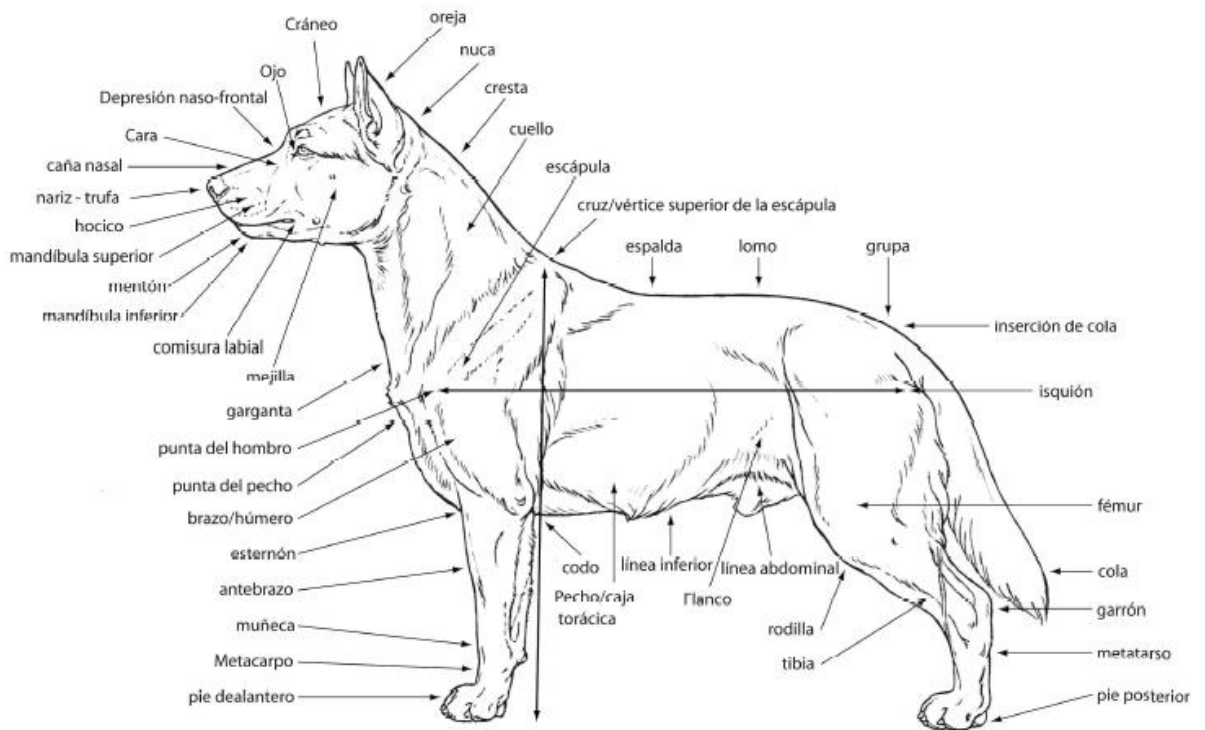


Figura 7. Rasgos anatómicos del perro

(Federación Cinológica Nacional, 2013)

En muchas partes del mundo las personas han considerado a los perros como despensas ambulantes que hay que llenar en las épocas de abundancia a base de alimentarlas en exceso para después realizar la cosecha cuando llega la escasez de proteínas. Los aztecas desarrollaron una raza sin pelo expresamente, para consumo, siendo la carne de perro un alimento básico entre muchas tribus indias de América del Norte. Aunque su consumo se prohibió en 1998, la carne de perro sigue formando parte de la dieta de ciertas zonas de Filipinas. En África a veces se castra y se alimenta con abundancia a los perros, antes de sacrificarlos para estimular su engorde. La población china es la que más carne de perro come. Los jamoncitos de cachorro son la parte preferida. La carne de perro iguala en precio a la de buey. En 2004, cuatrocientos gramos de carne de perro cruda en las tiendas en el continente asiático costaba 2 dólares (Hal, 2012).

1.6. Técnicas para detectar adulteraciones en alimentos

1.6.1. Definición de alimento adulterado

Un alimento adulterado es aquel que ha sido modificado por el hombre, alterando sus características o cualidades propias sin que se declaren expresamente en la etiqueta, por ejemplo extrayendo o sustituyendo alguno de los componentes propios del alimento. Esto puede encubrir una calidad inferior del producto (Reglamento Sanitario de los Alimentos, 2000; FAO, 2014).

La detección del origen de las especies de la carne y de los productos cárnicos es esencial para proteger al consumidor de pérdidas económicas, salud e implicaciones religiosas (Mane *et.al.*, 2011).

1.6.2. Tipos de adulteración

Un alimento está adulterado cuando se presenta, por lo menos una de los siguientes escenarios:

1. Completa o parcial omisión de los constituyentes de alto valor.
2. Total o parcial sustitución con componentes alimenticios de menor calidad o valor económico.
3. Encubrimientos de daños o de calidad inferior.
4. Adición de materiales o sustancias no declaradas en la etiqueta, con el fin de incrementar el peso o volumen del producto (Hargin, 1996).

1.6.3. Técnicas inmunoenzimáticas

Los ensayos que usan como marcador enzimas (técnicas inmunoenzimáticas, inmunoensayos enzimáticos o ensayos inmunoenzimáticos) presentan extraordinarias ventajas como:

- Elevada sensibilidad, detectabilidad y especificidad.
- Equipamiento relativamente barato.
- Procedimientos técnicos rápidos y sencillos.
- Alta precisión y exactitud.
- Reactivos relativamente baratos y de larga vida.
- Gran variedad de sustratos cromógenos que incrementa su versatilidad.

Estos ensayos se apoyan en tres características biológicas fundamentales: la extraordinaria especificidad de los anticuerpos, el elevado poder catalítico y la alta especificidad de las

enzimas. Mediante la combinación de la reacción inmunológica con un indicador altamente sensible, el débil efecto inmunológico se ve reforzado por la amplificación enzimática, de forma que consigue una elevada sensibilidad y detectabilidad (Ochoa, 2012).

1.6.4. Técnicas de Biología Molecular

- **Hibridación**

La hibridación está basada en el proceso de renaturalización de dos cadenas sencillas de un ADN, que se observa, por ejemplo, al enfriar de forma lenta una disolución del ADN bicatenario previamente desnaturalizado por calor. La especificidad del emparejamiento mediante puentes de hidrogeno entre bases complementarias (A-T, A-U o G-C) de moléculas monocatenarias contiguas da lugar a estructuras bicatenarias, de gran estabilidad. Cuando ambas moléculas corresponden a las hebras de moléculas diferentes adquiere sentido el término hibridación. El resultado pueden ser híbridos ADN-ADN, híbridos ARN-ARN o híbridos ADN-ARN. Todos los ensayos de hibridación se basan en la gran especificidad de la interacción entre bases complementarias. Para que la hibridación permita identificar en un genoma, u otra muestra cualquiera de ácido nucleico, una secuencia particular se requiere dos elementos básicos:

*La presencia de la secuencia diana en uno de los fragmentos de la muestra de ácido nucleico, generalmente obtenidos usando enzimas de restricción.

*El empleo de una sonda (sonda molecular, sonda de hibridación), que es un oligonucleótido (fragmento corto de ácido nucleico) de secuencia conocida, marcado de forma que permita su detección. La secuencia de la sonda ha de ser complementaria a la secuencia diana que se pretenda detectar, y su marcaje puede ser con un isopo radiactivo, un cromóforo, un fluoróforo, una enzima, etcétera (Herráez, 2001).

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Fundamento

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por su sigla en inglés), desarrollada en 1983, permite amplificar fragmentos de ADN mil millones de veces en unas pocas horas. Puede utilizar cantidades extremadamente pequeñas de ADN original, incluso una sola molécula. La base de la PCR es la replicación catalizada por una ADN polimerasa. La

replicación en este caso tiene dos requisitos fundamentales: 1) un molde de ADN monocatenario a partir del cual puede copiarse una nueva cadena de ADN y 2) un cebador con un grupo 3' –OH al que pueden agregarse los nuevos nucleótidos (Pierce, 2011).

Componentes

Muestra de ADN

Existen una serie de reglas sencillas para que el ADN molde no sea un problema en la reacción:

- Integridad del ADN: no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de lo que queremos amplificar.
- Origen de la muestra y proceso de extracción: la muestra no debe llevar agentes quelantes (EDTA) que reducen la concentración de iones de Mg. en la disolución. Tampoco debe haber determinados factores sanguíneos, fenol, detergentes que inhibirían la actividad de la polimerasa.
- Cantidad de la muestra: si se dispone de suficiente cantidad para la amplificación de ADN genómico de copia única se usan cantidades de 100-500 ng. En el caso de zonas repetidas se puede reducir esta cantidad a 10-50 ng. El mínimo oscila entre 10-100 ng. y el máximo entre 400-500 ng (Mas, 2001).

Cebadores o primers

Para la elección de los primers, existen una serie de normas que pueden ayudar, aunque hay que indicar también que existen programas de ordenador que facilitan esta tarea (DNAsis, Primer3, etc.).

- El contenido en G + C debe ser aproximadamente del 50%. La relación máxima de purinas/pirimidinas será 60%/40%.
- Deben evitarse zonas con largas secuencias de una sola base.
- Se recomienda que los extremos las últimas bases sean G o C.
- Se debe evitar la complementariedad entre la pareja de primers. Si ésta existe entre los extremos 3', se aumenta la posibilidad de que se creen dímeros de primers.
- Normalmente deben tener un tamaño de 18-30 pb.

- La T° de hibridación de los primers ha de ser similar en ambos y será variable en función de la secuencia de los mismos. Generalmente oscila entre 45 y 65°C (Mas, 2001).

ADN Polimerasa

El descubrimiento de la ADN polimerasa de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa), permite el perfeccionamiento de la técnica. Esta enzima puede resistir a temperaturas de 95°C, necesarias para la separación de las dos hebras de ADN, y permite manejar temperaturas de alineamiento y amplificación que dejan margen para manejar la astringencia de la reacción y así acceder únicamente a las secuencias de ADN específicas (Zavala, 2005).

Existen diferentes tipos de ADN polimerasa que llevan a cabo la replicación del ADN, siguiendo el mismo método de síntesis. Se pueden clasificar en:

- Termolábiles: T° óptima de 37-42°C. Se desnaturalizan con el calor.
- Termoestables: T° óptima de 74 °C. Resiste durante 40-50' a 96°C (Mas, 2001).

Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)

Son cuatro: dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Se deben añadir en la solución de la reacción en concentraciones iguales que normalmente oscila entre los 20 y los 200 μ M. Los dNTPs pueden captar Mg⁺⁺, por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación. No debemos variar ninguno de ellos de manera independiente.

Tampón de la reacción

El tampón usado usualmente está compuesto básicamente por 100 Mm Tris-HCl, pH 8.3, 500Mm MgCl₂, se guarda concentrado 10 veces (Jiménez, 2003).

El dimetilsulfóxido (DMSO) añadido al buffer de la reacción en un 10% contribuye a la disminución de la estructura secundaria del ADN (Anderson, 1990). También se pueden usar detergentes como el tween 20, laurth 12 (0.1%) o Tritón x10, que ayudan a estabilizar la enzima. Existen también protocolos que incorporan polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida, seroalbúmina bovina (BSA), etc., aunque no son en ningún caso imprescindibles (Mas, 2001).

Sales

Es de gran importancia la concentración de dos cationes que son añadidos en forma de sales.

- Cloruro potásico (KCl). Influye en la desnaturalización del ADN.
- Elevadas concentraciones del ión K^+ favorece la desnaturalización de secuencias cortas de ADN.
- Bajas concentraciones de K^+ ayudan a la desnaturalización de secuencias largas de ADN.
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Aumenta la temperatura de hibridación del ADN. La concentración de este ion resulta fundamental para la optimización de la reacción.
- Altas concentraciones de Mg^{2+} disminuyen la especificidad de la PCR.
- Bajas concentraciones de Mg^{2+} aumentan la especificidad de la reacción (Mas, 2001).

Etapas de la reacción

Mullis se basó en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido $5' \rightarrow 3'$ usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena se usan los denominados primers ("primers"). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos $3'$ del fragmento de ADN que se desea amplificar (Mas, 2001).

Partiendo de este principio, la reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas, esquematizado en la Figura 7:

1ª Desnaturalización del ADN doble cadena: En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas ($93-97^\circ C$). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya (Mas, 2001).

2ª Hibridación de los primers a la zona $3'$ específica de cada una de las hebras

En el segundo paso (hibridación) los primers se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65°C) (Mas, 2001).

3ª Extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' → 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los deoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde (Mas, 2001).

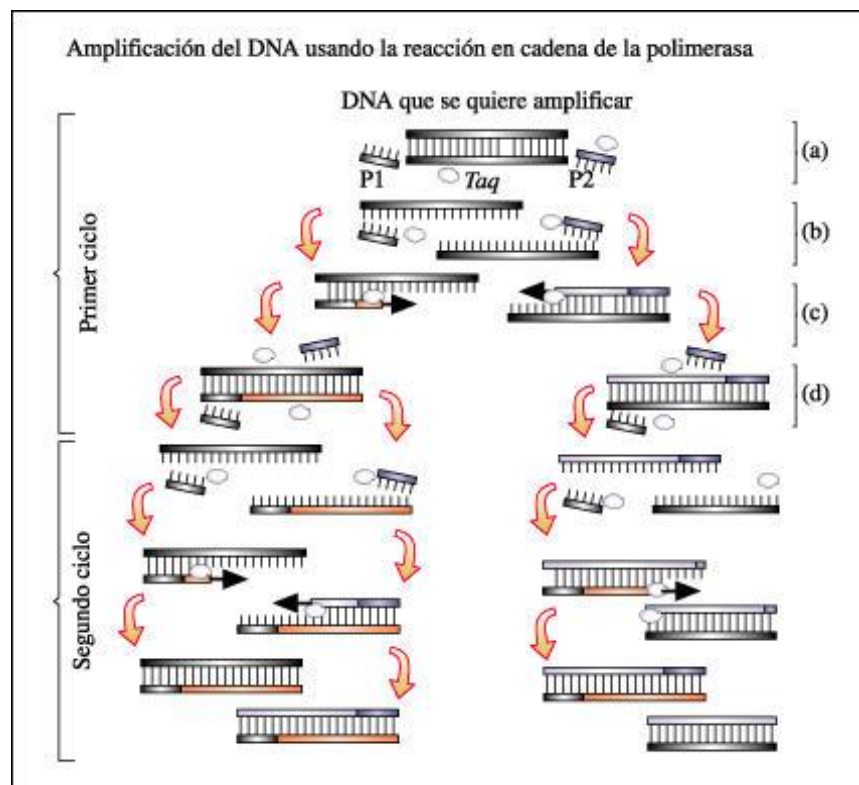


Figura 8. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa: a) Mezcla de los componentes de la reacción, b) Desnaturalización, c) Hibridación y d) Elongación.

Desventajas de la técnica

Presenta una importante limitación, produce una alta tasa de errores en la incorporación de dNTPs; la polimerasa Taq carece de actividad exonucleasa 3' a 5', por lo tanto, de la capacidad para la revisión del nucleótido incorporado y, en su caso, para su degradación y sustitución por el correcto. Esto provoca la incorporación de errores con una frecuencia de

alrededor de 1×10^{-4} por ciclo, lo que se traduce en la aparición de un 0.25% de fallos tras 30 ciclos de amplificación (Perera, 2002).

Evaluación de productos de la reacción de PCR

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es un método normalizado que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Se trata de una técnica sencilla y rápida que permite diferenciar fragmentos de ADN que no pueden separarse adecuadamente con otros procedimientos. Por otra parte, el ADN puede localizarse en el gel tiñendo con una concentración baja de bromuro de etidio, que es un agente intercalante fluorescente que se utiliza como colorante (Westermeier, 1997).

La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel. Las propiedades de una molécula determinan la velocidad con que un campo eléctrico puede desplazarla a través de un medio gelatinoso. Muchas macromoléculas biológicas importantes (por ejemplo, los aminoácidos, los péptidos, las proteínas, los nucleótidos y los ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y, a un pH determinado, existen en solución como especies cargadas eléctricamente, sean cationes (+) o aniones (-). Según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el cátodo o hacia el ánodo. Así, por ejemplo, cuando se aplica un campo eléctrico a un gel con pH neutro, los grupos fosfato del ADN cargados negativamente lo harán migrar hacia el ánodo (Westermeier, 1997).

Tamaño del Fragmento

Las moléculas lineales de ADN de doble cadena se desplazan en los geles de agarosa de una manera inversamente proporcional al \log_{10} de sus tamaños moleculares como se observa en la Figura 8, de modo que a menor tamaño, mayor velocidad de migración (Puerta, 2005).

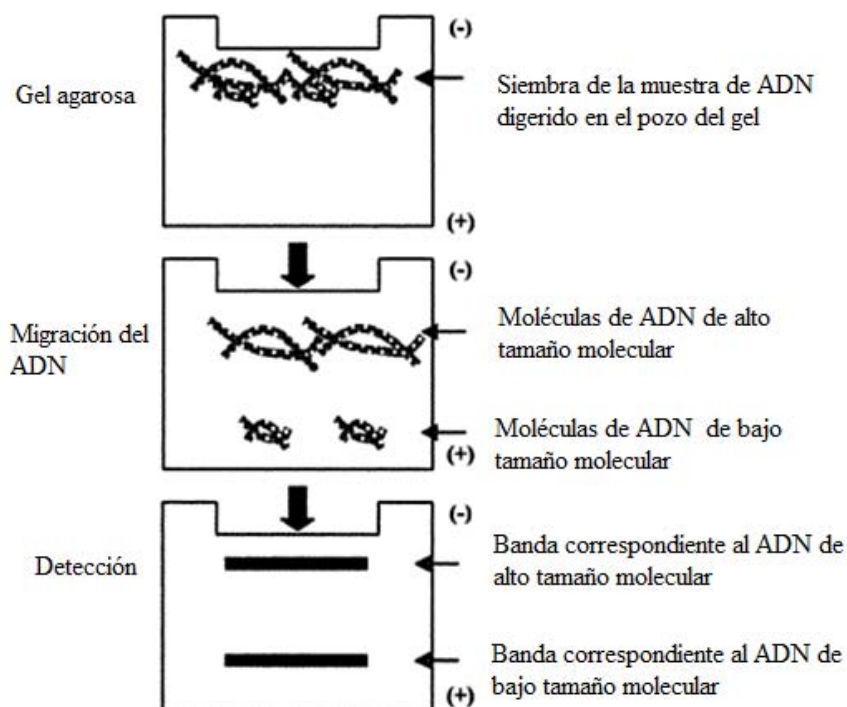


Figura 9. Esquema de la migración de las moléculas de ADN lineales de doble cadena en geles de agarosa, las moléculas se separan de acuerdo al tamaño molecular (Puerta, 2005)

Concentración de agarosa

Existe una relación lineal entre el logaritmo de la movilidad electroforética del ADN y la concentración del gel: a mayor concentración menor rango de separación.

Cuadro 2. Relación entre concentración de agarosa en el gel entre la eficiencia en el rango de separación de las moléculas de ADN

Concentración de agarosa en gel (%)	Eficiencia en el rango de separación de moléculas lineales de ADN (kb)
0.3	5.0-60.0
0.6	1.0-20.0
0.7	0.8-1.0
0.9	0.5-7.0
1.2	0.4-6.0
1.5	0.2-3.0
2.0	0.1-2.0

(Puerta, 2005).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. JUSTIFICACIÓN

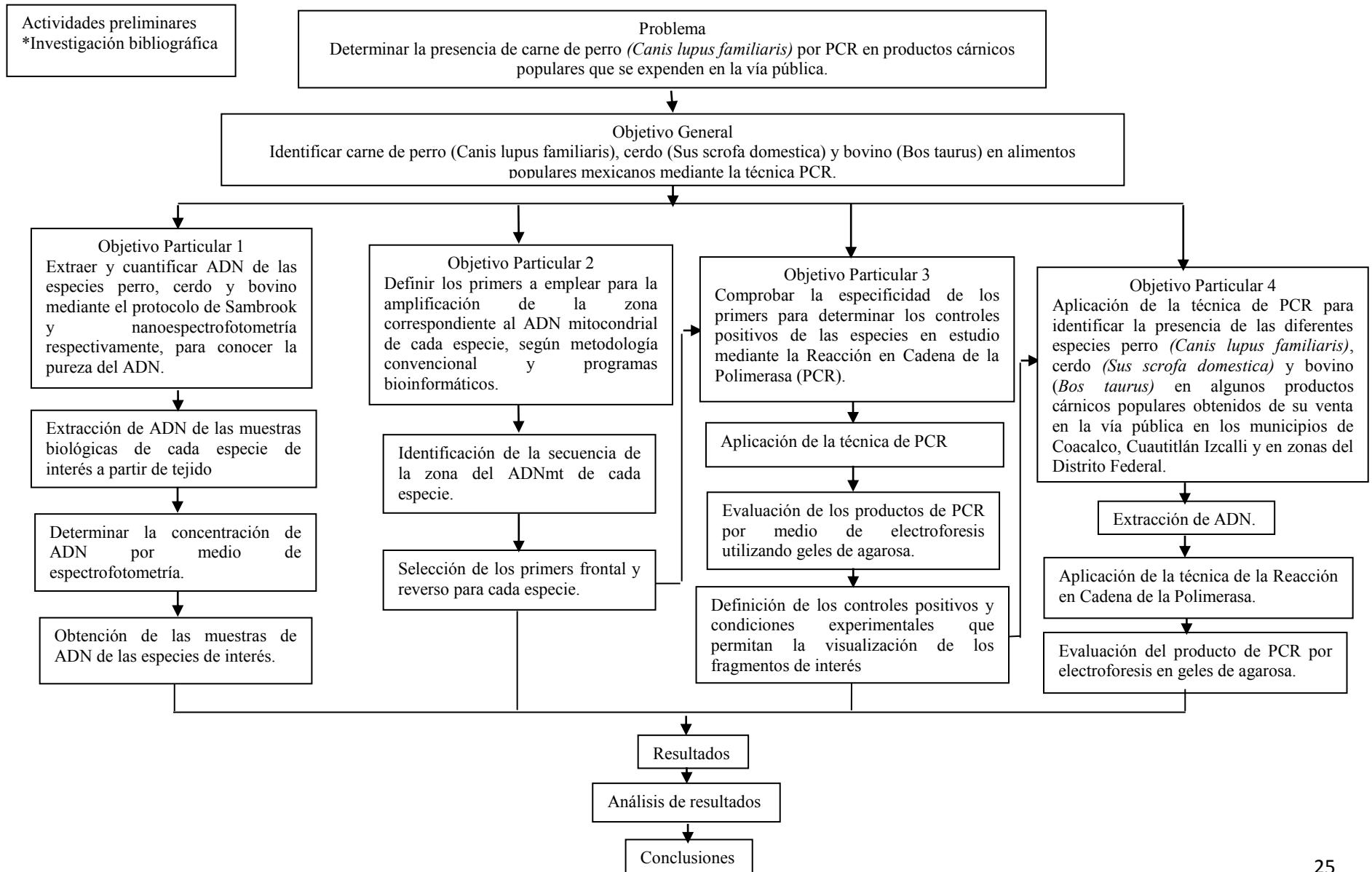
La autenticación de carne tiene significancia en el aspecto del aseguramiento de calidad, seguridad alimentaria, salud pública, conservación y asuntos legales (Kumar, 2012). La adulteración de los alimentos no sólo causa perjuicios en los consumidores, sino que también afecta severamente al sector productivo, ya que la industria procesadora puede comprar materia prima de inferior calidad transformándola y haciéndola pasar como de buena calidad, ocasionando una competencia desleal (Hernández *et al.*, 2007).

Se debe contar con herramientas analíticas y sensibles para dicha identificación tales como el análisis de fragmentos (como el ADN), por ello es importante realizar protocolos basados en el estudio de ADN en especial de origen mitocondrial dada su particularidad de ser específica de especies (Aranguren, 2009), con los cuales se puedan detectar adulteraciones en los alimentos y así se pueda proteger al consumidor, además de reducir procedimientos fraudulentos en la elaboración y comercialización de alimentos.

Por otro lado, el ADN es una molécula relativamente estable, proporciona información idéntica de todos los tejidos de un organismo, y es capaz de soportar el calor extenso, tensiones de presión, y procesamiento químico de alimentos (Ali *et al.*, 2011).

La identificación del origen de la especie de carne presenta un problema considerable para los analistas de alimentos y las autoridades legales en muchas partes del mundo. En muchos países en desarrollo, el analista de alimentos se enfrenta a realizar pruebas de sustitución fraudulenta de las carnes más caras con las carnes más baratas. Además las organizaciones de protección animal deben diferenciar la carne de especies protegidas de la de especies no protegidas y animales domésticos (Abdulmawjood, 2003).

2.2 CUADRO METODOLÓGICO



2.2.1. Problema

Determinar la presencia de carne de perro (*Canis lupus familiaris*) por PCR en productos cárnicos populares que se expenden en la vía pública.

2.2.2. Objetivo General

Identificar la presencia de carne de perro (*Canis lupus familiaris*), cerdo (*Sus scrofa domestica*) y bovino (*Bos taurus*) en productos cárnicos populares mediante PCR.

2.2.3. Objetivos particulares

2.2.3.1. Objetivo Particular 1

Extraer y cuantificar ADN de las muestras biológicas de las especies perro, cerdo y bovino mediante el protocolo de Sambrook y nanoespectrofotometría respectivamente, para conocer la pureza del ADN.

Actividades:

- Obtención de las muestras de ADN de las especies de interés.
- Extracción de ADN de las muestras biológicas de cada especie de interés a partir de tejido.
- Determinar la concentración de ADN por medio de nanoespectrofotometría.

2.2.3.2. Objetivo Particular 2

Definir los primers a emplear para la amplificación de la zona correspondiente al ADN mitocondrial de cada especie, según metodología convencional y programas bioinformáticos.

Actividades:

- Identificación de la secuencia de la zona del ADN mitocondrial de cada especie.
- Selección de los primers frontal y reverso para cada especie.

2.2.3.3. Objetivo Particular 3

Comprobar la especificidad de los primers para determinar los controles positivos de las especies en estudio mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Actividades:

- Aplicación de la técnica de PCR.

- Evaluación de los productos de PCR por medio de electroforesis utilizando geles de agarosa para cerdo y bovino, en el caso de la especificidad de perro se usa el gel de poliacrilamida.
- Definición de los controles positivos y condiciones experimentales que permitan la visualización de los fragmentos de interés

2.1.3.4. Objetivo Particular 4

Aplicación de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para identificar la presencia de las diferentes especies: perro (*Canis lupus familiaris*), cerdo (*Sus scrofa domestica*) y bovino (*Bos taurus*) en algunos productos cárnicos populares obtenidos de su venta en la vía pública en los municipios de Coacalco, Cuautitlán Izcalli y en zonas del Distrito Federal.

Actividades:

- Extracción de ADN.
- Aplicación de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- Evaluación del producto de PCR por electroforesis en geles de agarosa.
- Prueba de sensibilidad de la técnica de PCR en mezclas de carne de perro y cerdo.

2.3. Material

2.3.1. Reactivos biológicos

2.3.1.1. Muestras biológicas

Tejido muscular de perro (*Canis lupus familiaris*).

Tejido muscular de cerdo (*Sus scrofa domestica*).

Tejido muscular de bovino (*Bos taurus*).

2.3.1.2. Muestras comerciales

Muestra comercial de carne procesada al pastor 1

Muestra comercial de carne procesada al pastor 2

Muestra comercial de carne procesada al pastor 3

Muestra comercial de carne procesada al pastor 4

Muestra comercial de carne procesada al pastor 5

Muestra comercial de carne procesada de suadero 1

Muestra comercial de carne procesada de suadero 2

Muestra comercial de carne procesada de suadero 3

Muestra comercial de carne procesada de suadero 4

Muestra comercial de carne procesada de suadero 5

2.3.2. Reactivos químicos

Agua libre de nucleasas pH 7.

Solución de lisis (Tris base 50mM, pH=8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%).

Enzima Proteinasa K.

Mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (12:24:1).

Etanol 70% frío.

Agarosa, *Gibco ERL*.

Tris acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8.

Bromuro de etidio (Bret) de 10mg/mL.

Marcador de peso molecular, *Promega*.

Tinte cargador azul/naranja 6X, *Promega*.

2.3.3. Equipo de laboratorio

Tubos eppendorf.

Agitador vortex, *Genie K-55-G*.

Balanza electrónica, *Cole parmer PR410 Equipar 500mg*.

Termoblok thermomixer, *compact eppendorf*

Juego de micropipetas, *Rainin*.

Microcentrífuga, *Mminispin plus eppendorf 14000rpm*.

Espectrofotómetro, *Accesolab NanoDrop nd-1000 A113*.

Kit para PCR, *Promega* que contiene:

- Agua libre de nucleasas.
- PCR Master Mix (50 unidades de Taq ADN Polimerasa, 400µM de cada dNTP y 3mM de MgCl₂).

Termociclador, *Apollo ATC4011 CLP*.

Fuente de poder, *Bio-Rad PowerPac 200*

Cámara y cassette de electroforesis, *Apollo 75.710*

Parafilm

2.4. Métodos

2.4.1. Extracción de ADN total de las muestras de cada especie.

La extracción de ADN de las muestras de cerdo, bovino y perro se realizaron a través del protocolo de Sambrook; 2001, el protocolo se basa en disgregación del tejido mediante disoluciones de detergente y proteinasa K, se realiza una extracción de proteínas y polisacáridos utilizando la mezcla fenol-cloroformo-álcohol isoamílico y el ADN genómico es precipitado con etanol.

1. Congelar el tejido de las especies de estudio y congelarlo con nitrógeno líquido o en su defecto en un congelador normal.
2. Moler el tejido congelado en un mortero con pistilo.
3. De la muestra molida pesar 125µg en un tubo Eppendorff.
4. Adicionar a este tubo 1250µL de solución de Lisis.
5. Agitar vigorosamente con vortex hasta que se visualicen pedazos pequeños.
6. Agregar 7µL de proteinasa K (concentrada a 20mg/mL).
7. Incubar los tubos a 50°C en el Termoblok con agitación por 2 horas.
8. Inactivar la proteinasa K incrementando la temperatura a 60°C por 1 hora.
9. Adicionar al tubo 250µL de la mezcla fenol-cloroformo-álcohol isoamílico.
10. Mezclar invirtiendo el tubo varias veces suavemente.
11. Centrifugar la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos a 10 000rpm.
12. Transferir la fase acuosa a dos tubos Eppendorff nuevos, esta fase contiene el ADN por eso es importante evitar tocar cualquiera de las otras fases.
13. Agregar 1500µL de etanol al 70 % (frio) a cada uno de los tubos con la fase acuosa y mezclar suavemente.
14. Centrifugar durante 10 minutos a 10 000rpm.
15. El ADN se debe visualizar como un pellet blanco pegado al tubo.
16. Decantar cuidadosamente el etanol y dejar secar en la incubadora a 37°C hasta evaporar el etanol restante de la decantación.
17. Resuspender el ADN agregando 50µL de agua libre de nucleasas agitando suavemente hasta su completa disolución.

2.4.2. Cuantificación de ADN por nanoespectrofotometría.

El espectrofotómetro permite calcular con elevada precisión concentraciones de ADN (doble cadena o cadena sencilla), ARN y proteínas en las muestras a partir de cantidades muy pequeñas de muestra (2 μ L). Para cuantificar el ADN se utiliza una longitud de onda de 260 y 280 nm, esta relación de lecturas permite estimar la pureza de los ácidos nucleicos, el valor ideal es de 1.8, es decir, que el ADN tiene una pureza mayor; los valores mayores a 1.8 nos indican la presencia en mayor proporción de ARN y los valores menores a 1.8 la presencia de proteínas.

1. Encender la computadora
2. Abrir el programa de Nanodrop y seleccionar la opción de ácidos nucleicos.
3. Levantar la tapa metálica del espectrofotómetro y añadir 2 μ L de agua libre de nucleasas en el pedestal y cerrar la tapa.
4. Presionar en el botón “ok” en el monitor.
5. Remover el agua del espectrofotómetro y añadir nuevamente 2 μ L de agua libre de nucleasas en el pedestal del espectrofotómetro y bajar la tapa.
6. Escribir BLANCO en el recuadro de “Sample ID” y posteriormente dar click en el botón BLANK que se encuentra en la parte superior izquierda.
7. Abrir la tapa metálica, remover el agua y añadir 2 μ L de muestra y bajar la tapa.
8. En el recuadro “Sample ID” escribir el nombre de la muestra y posteriormente dar click en el botón “measure”.
9. Aparecerá una gráfica y los datos de absorbancia se encuentran del lado derecho inferior de la pantalla.
10. Limpiar el espectrofotómetro cuidadosamente.

2.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Primers: Las parejas de primers que se utilizarán para la amplificación de los fragmentos de ADN mitocondrial específicos para cada especie fueron obtenidos de referencias científicas; en el caso de la pareja de primers para perro fueron diseñados por Sharifah Bee Abd Hamid y col. en 2013 y se muestran a continuación

Cuadro 3. Primers que se utilizan para la PCR con secuencia de 5' a 3' y tamaño de amplificado

Primers	Secuencia 5'-3'	Tamaño de amplificado	Autor y año
Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Frontal: CCT TAC TAG GAG TAT GCT TG Reverso: TGG GTG ACT GAT GAA AAA G	100pb	Sharifah Bee Abd Hamid y col. 2013
Cerdo (<i>Sus scrofa domestica</i>)	Frontal: GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA Reverso: GCT GAT AGT AGA TTT GTG ATG ACC GTA	398pb	Matsunaga y col. 1999
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	Frontal: GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA Reverso: CTA GAA AAG TGT AAG ACC AGT AAT ATA AG	274pb	Matsunaga y col. 1999

Para llevar a cabo esta técnica es importante realizar una estandarización de las proporciones de cada componente de la PCR. Los primers deben de estar a una concentración de 250nM y el ADN se agrega en concentraciones bajas debido a que teóricamente en la reacción solo se necesita una copia de ADN molde para que de ella se obtengan miles de copias. Según el protocolo que precisa Promega para el Kit de PCR la muestra total de cada reacción es de un volumen total de 25µL como se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Componentes de la PCR

Componentes	Volumen control positivo (µL)	Volumen control negativo (µL)
Master mix	12.5	12.5
Primer Frontal	0.5	0.5
Primer Reverso	0.5	0.5
Agua libre de nucleasas	10.0	10.0
ADN molde	1.5	-

La PCR fue realizada usando las condiciones propuestas por Sharifah y col. en 2013 como se observa en la Figura 10 y consisten en una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 58°C por 30s y una extensión a 72°C por un minuto; la extensión final fue realizada a 72°C por 5 minutos.

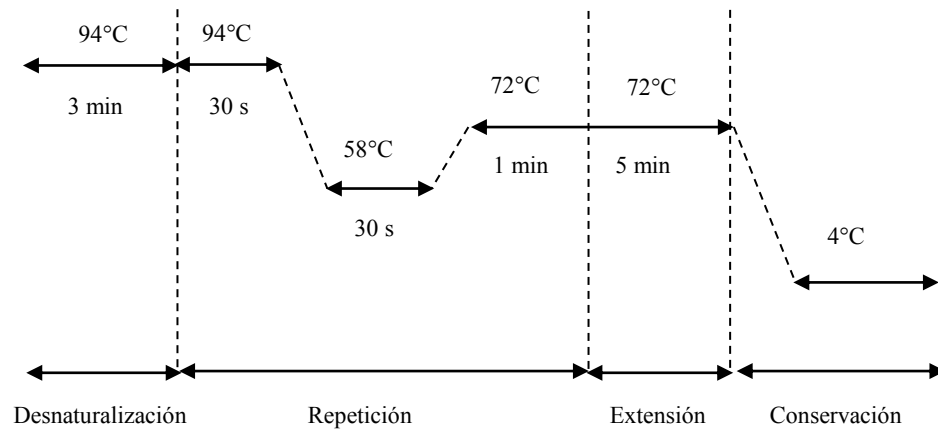


Figura 10. Etapas y condiciones de la PCR para perro

Las condiciones para la PCR de las especies de cerdo y bovino se eligieron de acuerdo a Matsunaga y col. en 1999 las cuales consisten en una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos y seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos, como se observa en la Figura 11.

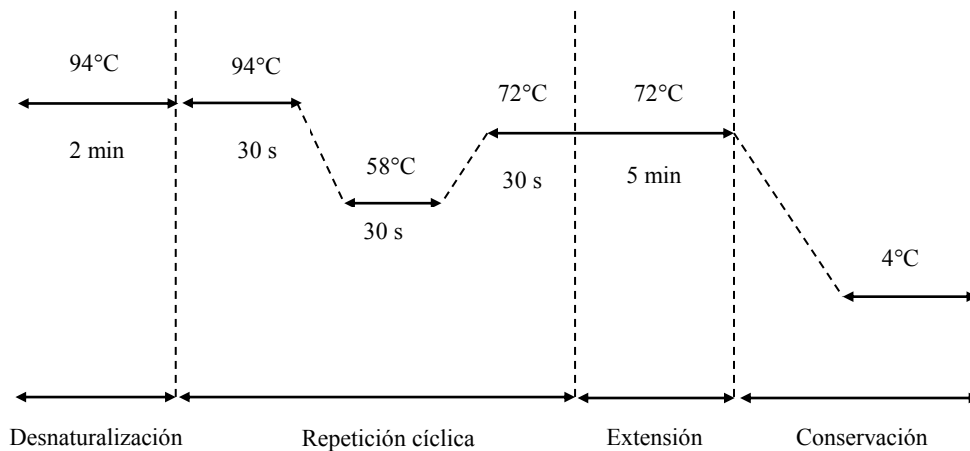


Figura 11. Etapas y condiciones de la PCR de las especies cerdo y bovino

2.4.4. Electroforesis en gel de agarosa.

Electroforesis en gel de agarosa es un método simple y altamente efectivo para separación, cuantificación y purificación 0.5 a 25 kb fragmentos de ADN. El protocolo puede estar dividido en tres etapas: 1) un gel es preparado con una concentración de agarosa apropiada para el tamaño del fragmento de ADN para ser separado; 2) las muestras de ADN deben ser cargadas en los pozos y el gel se corre a un voltaje y por un periodo de tiempo que debe ser el óptimo para la separación; y 3) el gel con el bromuro de etidio incorporado y el buffer de electroforesis, es visualizado directamente en un transluminador de luz UV (Ausubel, 2003).

Etapa 1: Preparación del gel

1. Medir 50mL de buffer TAE1X para diluir 0.5 gramos de agarosa y preparar el gel.
2. Meter al microondas para asegurar la mezcla.
3. Dejar enfriar a 55°C y para facilitar la visualización de los fragmentos de ADN agregar 0.5µg/mL de bromuro de etidio.
4. Llenar el cassette de electroforesis con la mezcla obtenida insertando el peine de electroforesis como se muestra en la Figura 12, asegurarse de que no queden burbujas atrapadas en los pozos y todas las burbujas en la superficie de la agarosa deben ser removidas antes de que el gel esté listo.

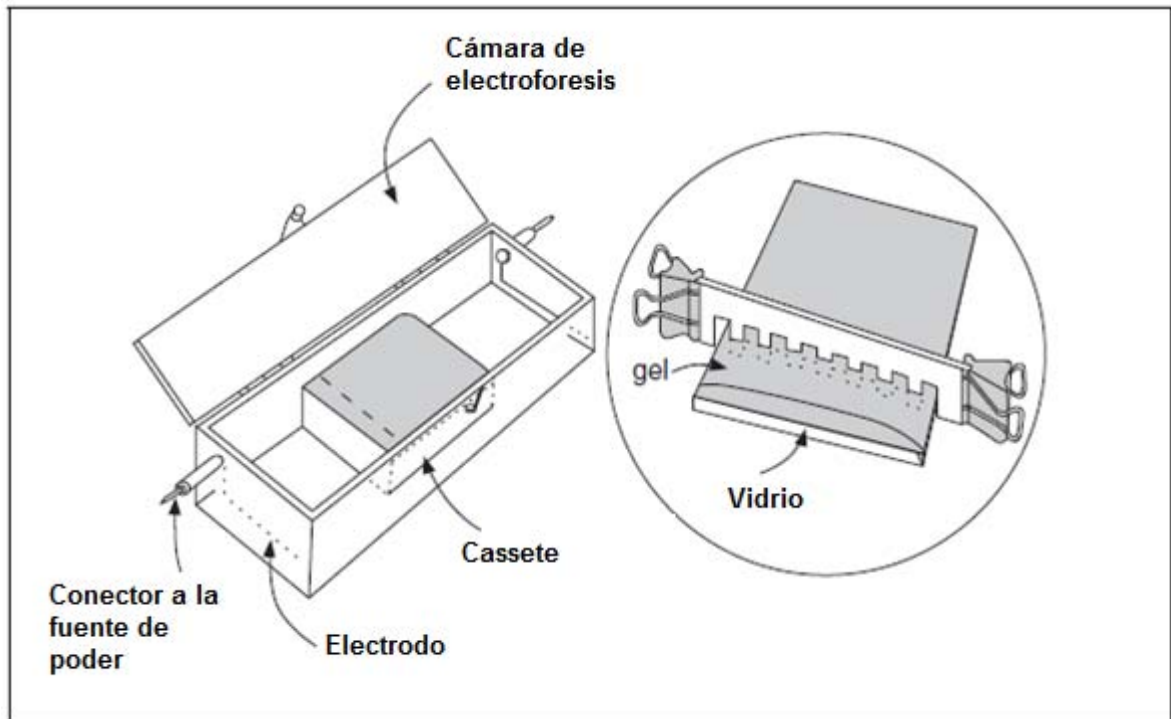


Figura 12. Materiales básicos para realizar una electroforesis en gel de agarosa y como se distribuyen para hacer el gel de agarosa.

Etapa 2: Cargar y correr el gel.

5. Después de que el gel ha gelificado quitar el peine del gel teniendo cuidado de no dañar los pozos para las muestras.
6. Agregar el buffer de electroforesis hasta que el gel este perfectamente sumergido y asegurando que no queden bolsas de aire en las paredes.
7. Las muestras de ADN (incluyendo el marcador molecular) deben estar preparadas en un volumen que no sobrepase los pozos del gel por adición de la cantidad apropiada del buffer. Las muestras se cargan dentro de los pozos con una micropipeta. Se debe tener cuidado de no mezclar las muestras entre ellas.
8. Asegurarse que los electrodos estén conectados a la fuente de poder así el ADN migrará dentro del gel hasta el anodo o polo positivo. Poner el voltaje en el nivel deseado, comúnmente 1 a 10 V/cm de gel, para empezar la electroforesis. El progreso de la separación puede ser monitoreado por la migración de los tintes en el gel.

9. Apagar la fuente de poder cuando el tinte de bromofenol azul haya migrado una distancia juzgada como suficiente para la separación de los fragmentos de ADN. Si el bromuro de etidio se incorporó al gel, el ADN puede ser visualizado colocándolo en un transluminador de luz UV y se podrá fotografiar directamente.

CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo Particular 1

Extraer y cuantificar ADN de las muestras biológicas de las especies perro, cerdo y bovino mediante el protocolo de Sambrook y nanoespectrofotometria respectivamente, para conocer la pureza del ADN.

Mediante el protocolo descrito por Sambrook se llevaron a cabo las extracciones de ADN de las especies de interés (cerdo y perro); el ADN obtenido se cuantificó a través del nanoespectrofotometro para conocer la pureza del ADN y su concentración en disolución de 50 μ L, los resultados de la cuantificación se observan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Cuantificación de muestras de ADN de Cerdo, Bovino y Perro sin diluir.

Muestra	260/280	ng/ μ L
Cerdo	1.57	244.9
Perro	1.91	3862.1

Uno de los requerimientos de la técnica de PCR es tener una concentración del ADN de 60 ng/ μ L aproximadamente y las concentraciones que se obtuvieron de la extracción fueron muy elevadas, por lo tanto se diluyó el ADN de cada especie para tener concentraciones aproximadas al valor deseado, los resultados se observan en el cuadro 6 siendo satisfactorios ya que permite llevar a cabo la técnica de PCR; en el caso del ADN de bovino ya se contaba con la disolución en 50 ng/ μ L.

Cuadro 6. Cuantificación de muestras de ADN de Cerdo, Bovino y Perro diluidas.

Muestra	260/280	ng/ μ L
Cerdo	1.47	56.8
Bovino	1.82	83.4
Perro	1.50	90.1

En el cuadro 6 se observan las concentraciones de ADN que se emplearán para la amplificación en la PCR, la relación 260/280 indica la pureza del ADN extraído siendo la de bovino de mejor calidad ya que es aproximado al valor ideal de 1.8, en el caso del ADN de cerdo y perro los valores son más bajos que el ideal, esto quiere decir que al hacer la

extracción quedaron residuos de proteínas pero aun así permiten trabajar con ellos en la técnica de PCR sirviendo como ADN molde para cada pareja de primers.

Objetivo Particular 2

Definir los primers a emplear para la amplificación de la zona correspondiente al ADN mitocondrial de cada especie, según metodología convencional y programas bioinformáticos.

Para cumplir este objetivo se realizó una revisión bibliográfica de artículos relacionados con el tema, siendo los artículos de Matsunaga y col., 1999 así como el de Sharifa y col., 2013, los que se usaron como referencia para obtener los primers a emplear en este trabajo. Del artículo publicado por Matsunaga y col., 1999 se obtuvieron los primers de cerdo y bovino, además de las condiciones de la PCR para amplificar la zona citocromo b del ADNmt. En él se describe el uso de un primer SIM para diferentes especies, esto quiere decir que es un mismo primer frontal para todas las especies (bovino, oveja, pollo, cerdo, caballo y cabra) y un primer reverso específico para cada especie, así permitía emplear la PCR múltiplex ya que todos amplifican bajo las mismas condiciones del programa de PCR

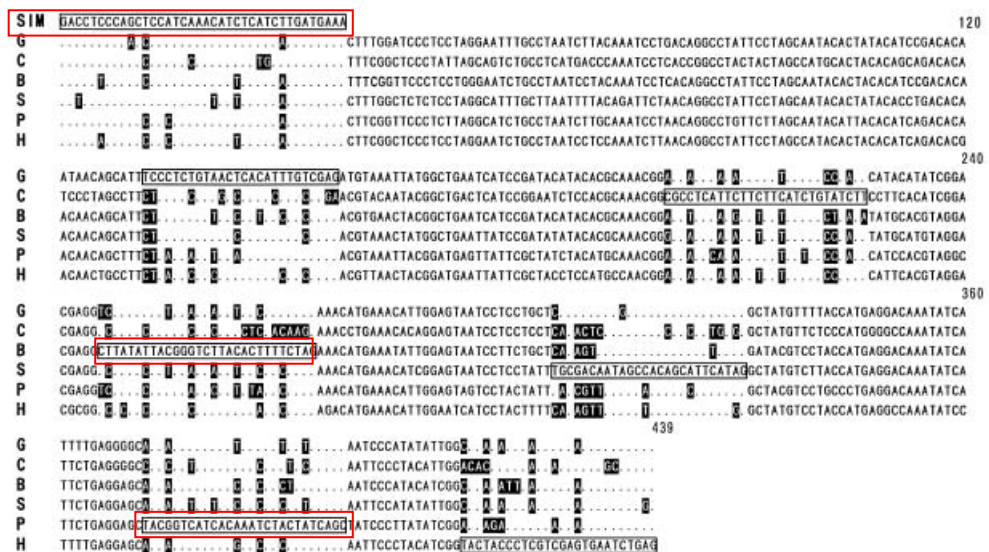


Fig. 1. Nucleotide sequences of the primers and target region on cytochrome b gene. Open boxes indicate the common forward primer SIM and complementary sequences of species-specific reverse primer. Dots and closed boxes indicate identical and different nucleotides to the primer sequences, respectively.

Figura 13. Secuencias de nucleótidos de los primers en el gen del citocromo b. SIM) Primer frontal universal para las especies de cerdo y bovino, G) Primer reverso específico para bovino y P) Primer reverso específico para cerdo.

El tamaño de amplificado de para bovino es de 274pb y para cerdo es de 398pb. Para obtener los primers de perro se utilizó el artículo de Sharifa y col. 2013 al igual que las condiciones para llevar a cabo la PCR y amplificar la zona del citocromo b del ADNmt.

En el proceso de estandarización de la técnica de PCR se modificó el programa propuesto en el artículo, únicamente la temperatura de hibridación se disminuyó de 58°C a 54°C, ya que al aplicar el propuesto en el artículo no amplificaban los primers la zona del citocromo b, resultado que indujo al análisis de las temperaturas de hibridación de los primers frontal y reverso obteniendo el valor de 54°C a través del uso de programas bioinformáticos para calcular la temperatura de cada primer.

Objetivo Particular 3

Comprobar la especificidad de los primers para determinar los controles positivos de las especies en estudio mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para poder tener la certeza de que al emplear la PCR se está amplificando solamente la especie de interés se hizo una prueba para comprobar la especificidad de cada pareja de primers obteniendo así los resultados que se observan la figura 14 para cerdo, figura 15 para bovino y figura 16 para perro. Es importante mencionar que los ADN utilizados en cada una de las prueba de especificidad fueron previamente extraídos y aislados siendo conservados en congelación para su posterior uso.

Prueba de especificidad Cerdo

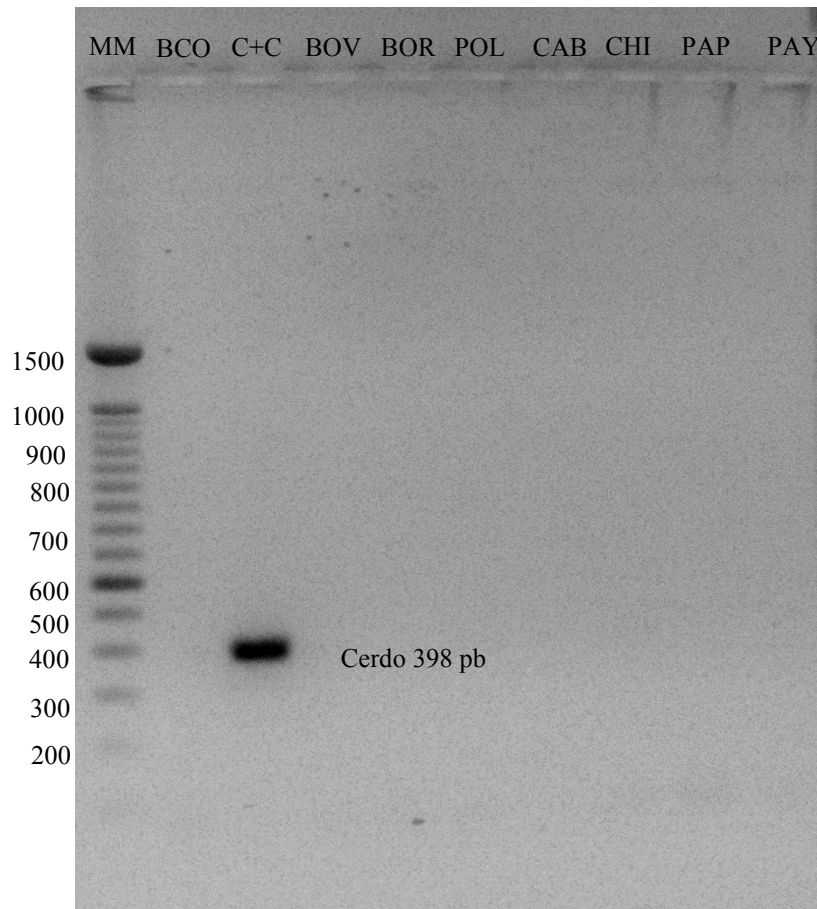


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 60 V para evaluación de la especificidad de los primers de cerdo.

MM) Marcador de peso molecular, BCO) Blanco, C+C) Control positivo de Cerdo, BOV) Bovino, BOR) Borrego, POL) Pollo, CAB) Caballo, CHI) Chile, PAP) Papa y PAY) Papaya.

En la figura 14 se observa el amplificado correspondiente a la especie de cerdo que es de 398pb, lo cual concuerda con el gel reportado por Matsunaga y col. 1999, además de que en los carriles correspondientes a las especies congénicas y no congénicas no se observa ningún amplificado, lo que nos lleva a tener la certeza de que los primers son específicos para la especie de cerdo, la intensidad del amplificado nos indica que las condiciones y la calidad del ADN permiten que la reacción se lleve a cabo satisfactoriamente.

Prueba de especificidad Bovino

Teniendo en cuenta que en la prueba de especificidad de cerdo los primers no amplificaron para la especie de bovino de igual manera para la prueba de especificidad de bovino se desea comprobar que únicamente los primers sean específicos y no amplifiquen para ninguna otra especie, sobre todo se usa la especie de cerdo porque tienen diferentes tamaños de amplificado y las dos parejas fueron diseñadas por el mismo autor.

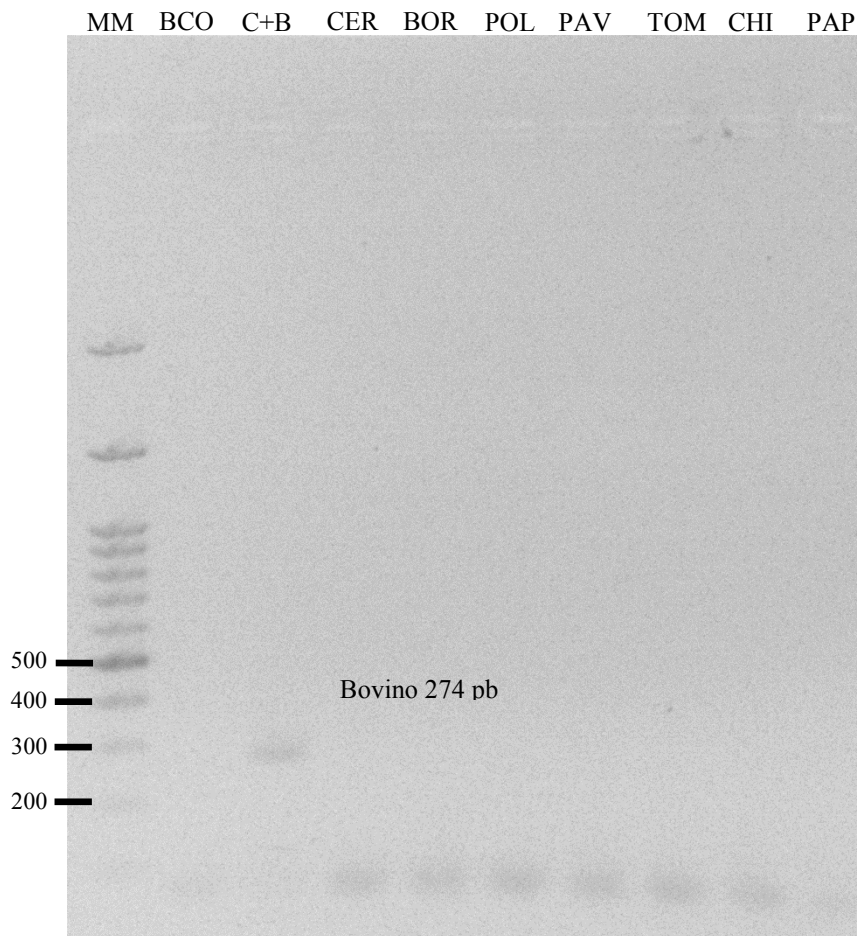


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 60 V para evaluación de la especificidad de los primers de bovino.

MM) Marcador de peso molecular, BCO) Blanco, C+B) Control positivo de Bovino, CER) Cerdo, BOR) Borrego, POL) Pollo, PAV) Pavo, TOM) Tomate, CHI) Chile, y PAP) Papa.

La Figura 15 demuestra que los primers son específicos para la especie de bovino con un amplificado de 274 pb, porque se puede observar un amplificado cercano a la banda de

300pb del marcador molecular, el amplificado se percibe muy tenue, esto se atribuye a que los primers ya tienen tiempo de haberse adquirido, esto reduce su eficiencia, además de que probablemente la reutilización de reactivos en la electroforesis disminuyó el rendimiento de los materiales.

Prueba de especificidad Perro

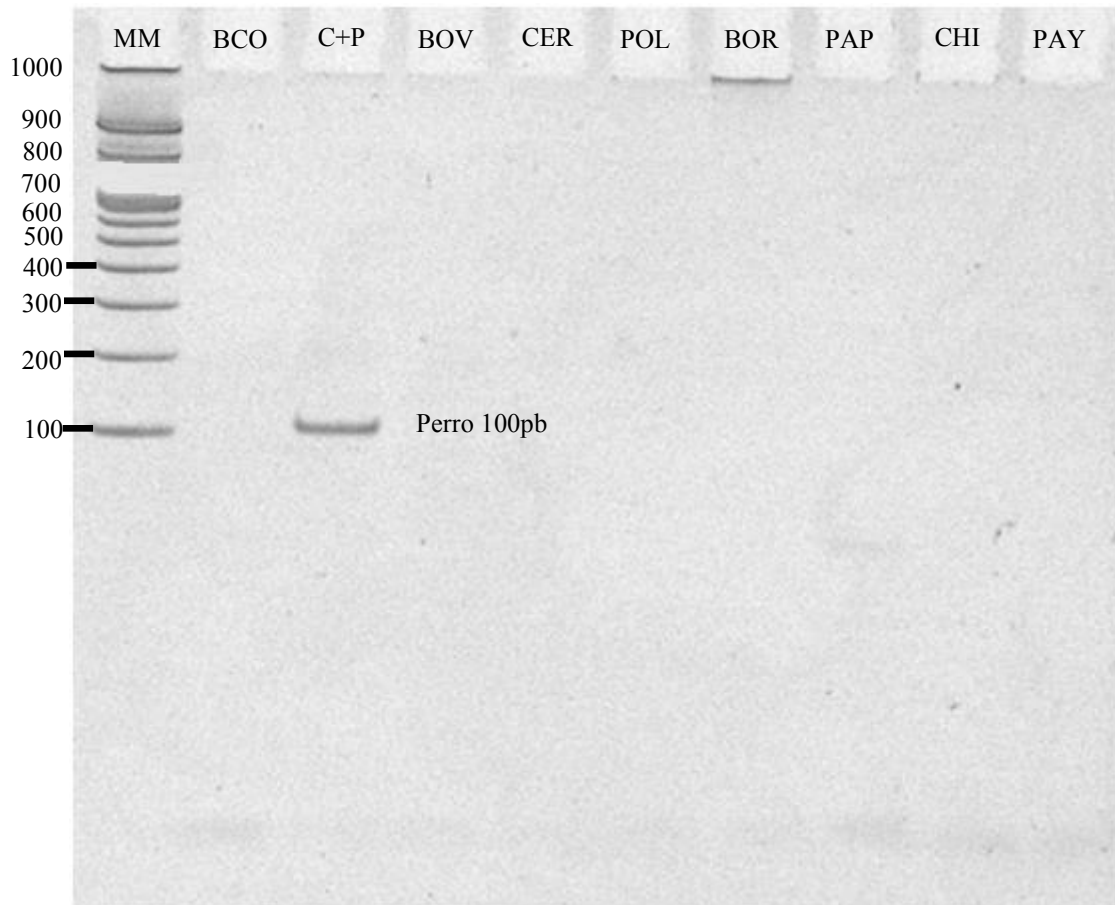


Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida a 70 V para evaluación de la especificidad de los primers de perro.

MM) Marcador de peso molecular, BCO) Blanco, C+P) Control positivo perro, BOV) Bovino, CER) Cerdo, POL) Pollo, BOR) Borrego, PAP) Papa, CHI) Chile y PAY) Papaya.

En la Figura 16 se visualiza el resultado de electroforesis en gel de poliacrilamida, se usa este tipo de gel porque la estructura del gel permite una mejor apreciación de amplificadores pequeños, en este caso como el tamaño de amplificado es de 100 pb, funciona mejor el gel

de poliacrilamida que el de agarosa; determinando así que los primers para la especie de perro son específicos y que no amplifican para ninguna otra especie. De acuerdo a los geles obtenidos mediante el empleo de la técnica de electroforesis se concluye que las parejas de primers si son específicas para cada especie ya que no amplifican para ninguna otra y sólo se observa el amplificado para los controles positivos, en el caso de Cerdo el tamaño del amplificado es de 398pb, el de Bovino es de 274pb y el de perro es de 100pb.

Objetivo Particular 4

Aplicación de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para identificar la presencia de las diferentes especies: perro (*Canis lupus familiaris*), cerdo (*Sus scrofa domestica*) y bovino (*Bos taurus*) en los algunos productos cárnicos populares obtenidos de su venta en la vía pública.

En primera instancia se recolectaron muestras en diferentes partes del Estado de México que fueron

Cuadro 7. Cuantificación de ADN de muestras comerciales de carne procesada para tacos de suadero y bovino sin diluir

Muestra	Nomenclatura	260/280	ng/μL
Muestra carne al pastor procesada 1	MP1	1.83	1417.3
Muestra carne al pastor procesada 2	MP2	1.85	489.5
Muestra carne al pastor procesada 3	MP3	1.91	1567.4
Muestra carne al pastor procesada 4	MP4	1.83	2260.0
Muestra carne al pastor procesada 5	MP5	1.75	1312.4
Muestra carne de suadero procesada 1	MS1	1.56	1528.1
Muestra carne de suadero procesada 2	MS2	1.61	387.5
Muestra carne de suadero procesada 3	MS3	1.54	1517.1
Muestra carne de suadero procesada 4	MS4	1.55	1268.0
Muestra carne de suadero procesada 5	MS5	1.91	2678.7

Para poder llevar a cabo la técnica de PCR se diluyó el ADN de las muestras comerciales a una concentración aproximada de 60 ng/μL, obteniendo así las concentraciones de ADN del cuadro 8.

Cuadro 8. Cuantificación de ADN de muestras comerciales de carne procesada para tacos de suadero y bovino diluidas

Muestra	Nomenclatura	260/280	ng/μL
Muestra carne al pastor procesada 1	MP1	1.75	69.8
Muestra carne al pastor procesada 2	MP2	1.74	64.3
Muestra carne al pastor procesada 3	MP3	1.87	61.7
Muestra carne al pastor procesada 4	MP4	1.70	66.2
Muestra carne al pastor procesada 5	MP5	1.65	62.0
Muestra carne de suadero procesada 1	MS1	1.48	69.3
Muestra carne de suadero procesada 2	MS2	1.47	73.2
Muestra carne de suadero procesada 3	MS3	1.47	68.3
Muestra carne de suadero procesada 4	MS4	1.48	79.1
Muestra carne de suadero procesada 5	MS5	1.79	72.6

Prueba de detección de cerdo en muestras de productos populares de carne al pastor y suadero.

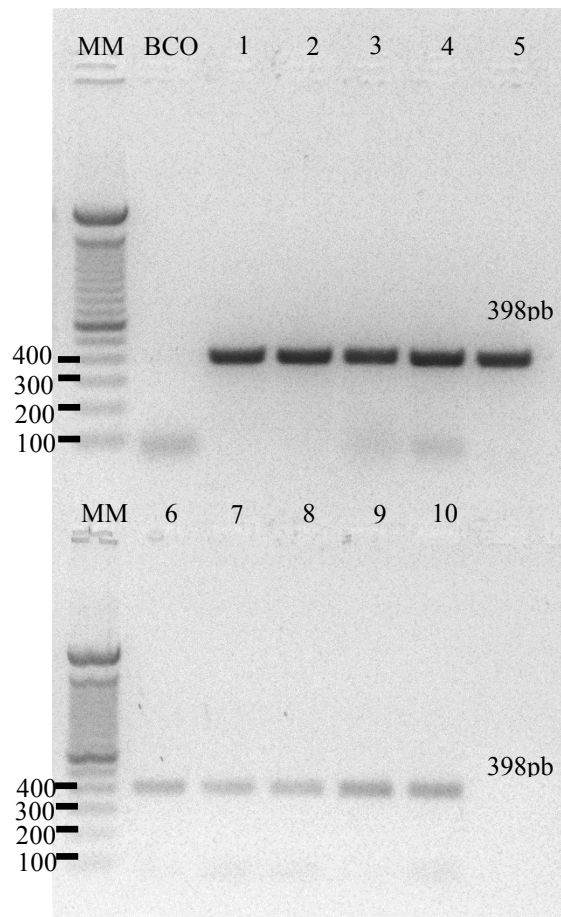


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 60 V para evaluación de las muestras de carne de los productos populares para detectar la presencia de Cerdo. MM), BCO), 1) MP1, 2) MP2, 3) MP3, 4) MP4, 5) MP5, 6) MS1, 7) MS2, 8) MS3, 9) MS4 y 10) MS5.

En la Figura 17, se aprecian los amplificadores correspondientes a la especie de cerdo, la intensidad indica que se encuentra en mayor concentración la carne de cerdo en las muestras que son de carne al pastor que en los de suadero, esto concuerda a la formulación que tienen los dos tipos de mezcla, ya que los productos populares cocidos de carne al pastor están preparados a base de carne de cerdo y los productos populares cocidos de suadero la base de la preparación es la carne de bovino, el amplificador de cerdo que se observa en los productos a base de bovino se atribuye a que combinen en diferentes

proporciones la carne de cerdo y bovino o que al momento de entrar en contacto se haga una mezcla cuando se estén preparando dichos productos, ya que en los expendios generalmente hay de diferentes tipos de mezclas de carne.

Prueba de detección de bovino en muestras de productos populares de carne de suadero y al pastor.

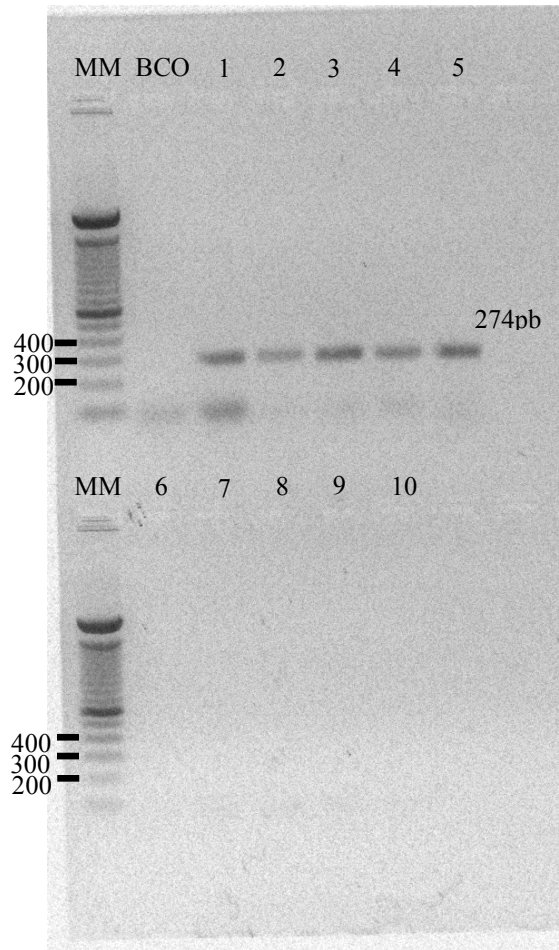


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 60 V para prueba de detección de bovino en muestras de productos populares de carne de suadero y al pastor. MM) Marcador de peso molecular, BCO) Blanco, 1) MS1, 2) MS2, 3) MS3, 4) MS4, 5) MS5, 6) MP1, 7) MP2, 8) MP3, 9) MP4 y 10) MP5.

En la figura 18 se observa el resultado de la electroforesis en gel de agarosa para la prueba de detección de carne de bovino en productos cocidos populares mexicanos, teniendo el conocimiento de que la carne de suadero está preparada a base de carne de bovino los

resultados fueron satisfactorios, ya que los primers detectaron la presencia de carne de bovino solo para las muestras de los productos cocidos populares a base de carne de bovino que son los de suadero y en los de carne al pastor no se detectó la presencia de ADN de bovino.

Prueba de detección de perro en muestras de productos populares cocidos de carne al pastor.

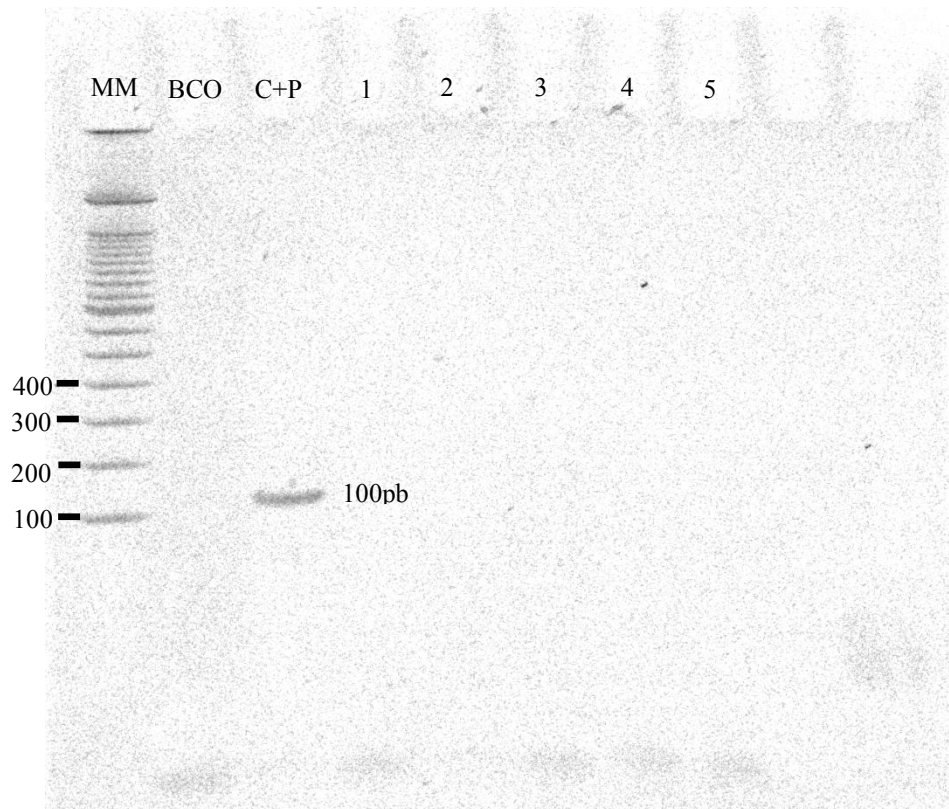


Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida a 70 V para prueba de detección de perro en muestras de productos cocidos populares mexicanos de carne al pastor. MM) Marcador de peso molecular, BCO) Blanco, C+P) Control positivo de perro, 1) MP1, 2) MP2, 3) MP3, 4) MP4 y 5) MP5.

En la figura 19 se muestra el gel de poliacrilamida, se realizó en este tipo de gel porque el tamaño del amplificado es de 100pb las cuales no se apreciarían en geles de agarosa ya que la estructura del gel de agarosa es más abierta y retiene fragmentos más grandes que el de poliacrilamida que retiene fragmentos más pequeños, en el gel solo se observa el amplificado perteneciente al control positivo de ADN de perro en el carril de C+P y en los

carriles siguientes no se aprecia ningún amplificado, lo que quiere decir que en las muestras de productos cocidos populares mexicanos al pastor no se encontró la presencia de carne de perro dentro de su formulación.

Prueba de detección de perro en muestras de productos cárnicos populares de suadero.

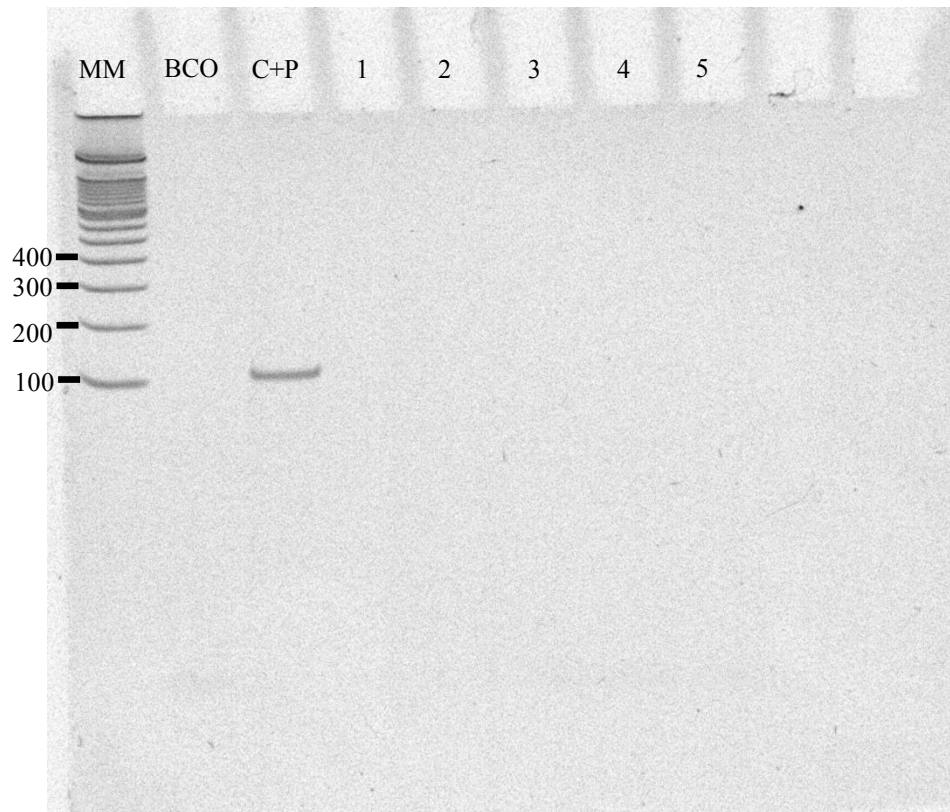


Figura 20. Electroforesis en gel poliacrilamida a 70 V para prueba de detección de perro en muestras de productos cocidos populares mexicanos de carne de suadero. MM) Marcador de peso molecular, BCO) Blanco, C+P) Control positivo de perro, 1) MS1, 2) MS2, 3) MS3, 4) MS4 y 5) MS5.

En la figura 20 se muestra el gel de poliacrilamida en el cual se cargaron los productos de la reacción en cadena de la polimerasa realizada para las muestras de productos cocidos populares mexicanos de suadero, al igual que en la figura 20 solo se observa el amplificado para el control positivo en el carril C+P y en los demás carriles no se registró ningún amplificado con lo que se concluye que tampoco se detectó la presencia de carne de perro dentro de la formulación.

En ambos casos se cargó el control positivo en el gel ya que no se tenía la certeza de encontrar carne de perro en las muestras, además de que con ello se demostraba la funcionalidad de la reacción al amplificar para el control positivo de perro.

Se realizó una prueba de sensibilidad de la técnica de PCR para detectar la presencia de carne de perro en combinación con carne de cerdo, esta prueba es derivada de los resultados anteriores ya que no se encontró la presencia de perro en los productos cocidos populares mexicanos. La prueba se desarrolló empleando diferentes concentraciones de carne de perro y cerdo, siendo el 100% el que representa el ADN extraído de tejido muscular de perro.

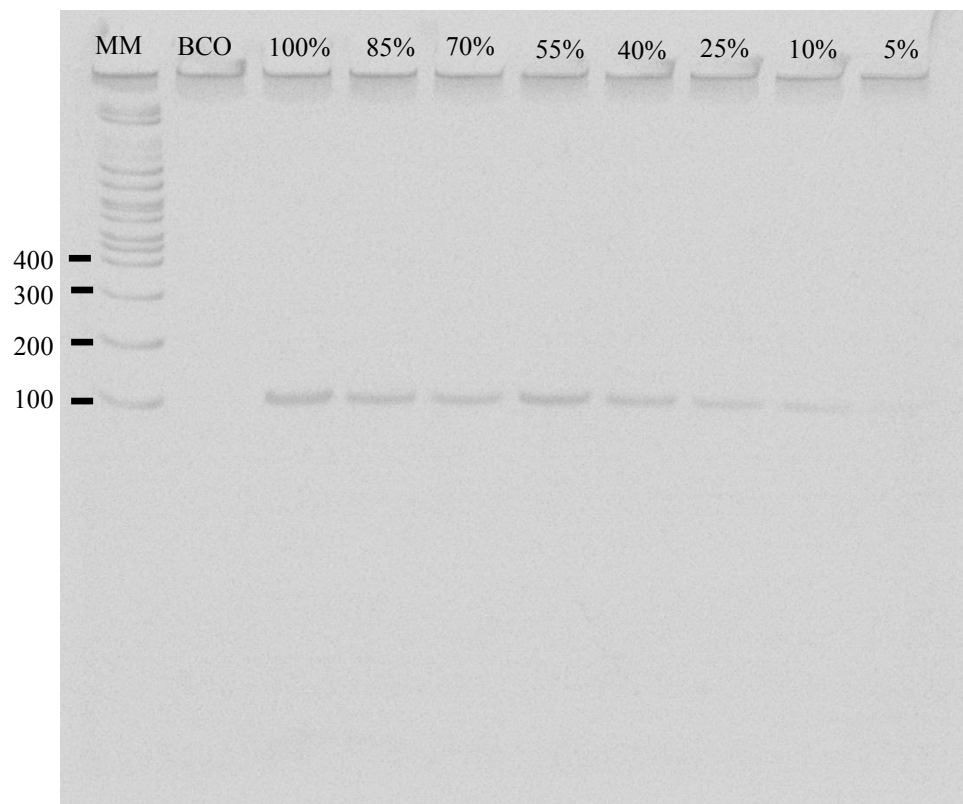


Figura 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida a 70 V para prueba de sensibilidad evaluando diferentes concentraciones de carne de perro en mezcla con carne de cerdo. MM) Marcador de peso molecular, BCO) Blanco, 1) 100% ADN tejido muscular de perro, 2) 85% perro + 15% cerdo, 3) 70% perro + 30% cerdo, 4) 55% perro + 45% cerdo, 5) 40% perro + 60% cerdo, 6) 25% perro + 75% cerdo, 7) 10% perro + 90% cerdo y 8) 5% perro + 95% cerdo.

En la figura 21 se observan los amplificadores para cada porcentaje de mezcla de carne de perro y cerdo, estas van del 100% al 5% de carne de perro, teniendo un amplificador más

intenso en el carril del 100% ya que es el ADN de carne de perro sin combinar y el amplificado más tenue que se observa el de 10%, esto quiere decir que la técnica tiene una sensibilidad para detectar la presencia de carne de perro del 10% ya que hasta ese porcentaje se pueden observar los amplificados.

CONCLUSIONES

El uso de la técnica de PCR en la autenticación de especies y detección de adulteraciones es de las más eficaces, confiables y específicas, características derivadas del uso del ADN de la especie de estudio para la identificación de éstas en muestras en las que se tenga la sospecha de que puedan contener elementos que no sean propios de los productos, en este caso la posible detección de carne de perro en productos cárnicos procesados que se expenden en la vía pública.

Los primers que se eligieron para el desarrollo del proyecto funcionaron correctamente, ya que en cada una de las experimentaciones para hacer la detección en las muestras recolectadas, los amplificados se ven de forma clara y nítida, solamente amplificando para la especie con la cual se estaba trabajando ya fuera de cerdo, perro o bovino.

La especificidad de las parejas de primers es de 100% ya que solamente amplificaron para las especies que fueron diseñadas, permitiendo así trabajar con las tres especies en conjunto y que no existiera ningún problema para identificar los amplificados en el gel de agarosa y poliacrilamida.

En relación a la aplicación de la reacción de cadena de la polimerasa funcionó de forma exitosa, ya que se observan los amplificados obtenidos en cada reacción, solo se realizó un cambio de temperatura media en el programa para amplificar ADN de perro con lo cual se obtuvo el amplificado y permitió llevar a cabo la experimentación correctamente, determinando así que de las muestras recolectadas en ninguna se detectó la presencia de carne de perro, ya que el porcentaje mínimo que detecta esta técnica es de 10 % del total de la muestra analizada, siendo un valor importante que permite concluir que la sensibilidad de la técnica es alta y confiable debido a que los primers son específicos para la especie de perro; la técnica de reacción en cadena de la polimerasa aplicada para las especies de cerdo y bovino fue de igual manera exitosa porque el amplificado de las especies se observó perfectamente en el gel de agarosa dando la oportunidad de determinar la presencia de las especies en cada una de las muestras recolectadas en expendios en la vía pública.

No se detectó la presencia de carne de perro en los productos cocidos de carne que se expenden en la vía pública, de los productos populares cocidos mexicanos de suadero solo se detectó la presencia de la especie de bovino y en el caso de los productos cocidos populares mexicanos de al pastor se detecta la presencia de carne de cerdo y de bovino, teniendo una mezcla de ambas especies siendo la de mayor concentración la especie de cerdo.

RECOMENDACIONES

Para complementar el proyecto se debería aumentar el número de muestras analizadas con la finalidad de proteger los derechos del consumidor, además de que no se han determinado científicamente las propiedades químicas de la carne de perro así que no se puede realizar un juicio sobre los efectos que tenga la ingestión de carne de perro al ser humano; teniendo en cuenta que el principal motivo por el cual no se consume carne de perro es la religión y que el perro es considerado como mascota y no como una fuente de energía.

REFERENCIAS

1. Abdulmawjood A., Schönenbrücher H., Bülte M. (2003). Development of a Polymerase Chain Reaction System for the Detection of Dog and Cat Meat in Meat Mixtures and Animal Feed. *Journal of Food Science*, 68, 1757-1761.
2. Aida AA, Che Man YB, Wong CMVL, Raha AR, Son R. (2005). Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. *Meat Science*, 69, 47–52.
3. Ali E. M., Hashim U., Sabar D. Th., Mustafa S., Che Man Y. B., Abdul L. M. (2011). Analysis of Pork Adulteration in Commercial Burgers Targeting Porcine-Specific Mitochondrial Cytochrome B Gene by TaqMan Probe Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Food Anal Methods*, 5, 784-794.
4. Anderson M. (1990). Perfecting the Polymerase Chain Reaction. *Laboratory Equipment Digests*, 1, 30-31.
5. Aranguren M. J., Portillo M., Ruíz J., Villasmil O. Y., Yañez L., Borjas L., Zabala W. (2009). Identificación de especies en productos de origen animal mediante PCR. *Maracaibo*, 19, 2.
6. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D., Seidman J. G., Smith J. A. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons. 4755p.
7. Blandino H. L. J. (2005). La Industria de la Carne Bovina en Centroamérica: Situación y Perspectivas. SIDE. Costa Rica. 74p.
8. Boitani, L., Francisci, F., Ciucci, P. & Andreoli, G. (1995). Population biology and ecology of feral dogs in central Italy. In: *The Domestic Dog. Its Evolution,*

Behaviour, and Interactions with People. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 217–244p.

9. Chandrika M., Zainon M. N., Maimunah M., Lesley M. B., Jinap S., Son R. (2009). Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. *Meat science*, 83, 57-61.
10. Danilo M. J. (1998.) Producción Porcina. EUNED. Costa Rica. 392p.
11. Esain E. J. (1973). Tecnología Práctica de la carne. Acribia. Zaragoza. España. 108p.
12. FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2012. Departamento de Cultura y Protección al Consumidor. www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/quality_meat.html (consulta Marzo 2014).
13. FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2012. Glosario de Términos. www.fao.org/docrep/014/am401s/am401s07.pdf (consulta Marzo 2014).
14. FCI, Federación Cinológica Internacional. 2013. Rasgos Anatómicos del perro. <http://www.fci.be/Nomenclature/Standards/336g08-es.pdf> (consulta Enero 2015).
15. Financiera Rural. Febrero 2012. Monografía Avicultura (Pollo). [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaPollo\(feb12\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaPollo(feb12).pdf) (consulta Abril 2014).
16. Financiera Rural. Febrero 2012. Ganado Bovino Carne. [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaCarneBovino\(feb2012\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaCarneBovino(feb2012).pdf) (consulta Abril 2014).

17. Financiera Rural. Junio 2009. Monografía Ganado Ovino.
http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografia_OvinoPDF.pdf (consulta Abril 2014).
18. Financiera Rural. Junio 2012. Monografía Ganado Porcino.
[http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaPorcinos\(jun2012\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaPorcinos(jun2012).pdf) (consulta Abril 2014).
19. Financiera Rural. Octubre 2012. Guajolote o Pavo.
[http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaGuajolote\(oct12\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaGuajolote(oct12).pdf) (consulta Abril 2014).
20. Hal H. (2012). Los amamos, los odiamos y...los comemos. Kairós. Barcelona. España. 405p.
21. Hargin, K. D. (1996). Authenticity issues in meat and meat products. *Meat Science*. 43: S277-S289.
22. Hernández C. J. F., et al. (2007). Técnicas analíticas para la determinación de la autenticidad de la carne y de los producto cárnicos procesados térmicamente. *Nacameh*, 1, 97-109.
23. Hernández R. M. (1999). Tratado de Nutrición. Díaz de Santos. Madrid. España. 1465p.
24. Herráez Á. (2001). Biología molecular e Ingeniería genética. El Servier. Barcelona. España. 281p.
25. INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. 2012. Calidad en puntos de venta de Carne.

<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Documents/MANUALES%20INIFAP/Calidad%20en%20puntos%20de%20venta%20de%20carne.pdf> (Consulta Mayo 2014).

26. Jiménez E. A. (2003). Manual de Neurogenética. Diaz de Santos. España. 293p.
27. Kumar D., Singh S.P., Karabasanavar S. N., Singh R., Umapathi V. (2012). Authentication of beef, carabeer, chevon, mutton and pork by a PCR-RFLP assay of mitochondrial *cytb* gene. *Food Science Technol.*
28. Lago F. C., Herrero B., Madriñá M., Vieites J. M., Espiñeira M. (2011). Authentication of species in meat products by genetic techniques. *Eur Food Res Technol*, 232, 509–515.
29. León B., Gloria G., Carrasco G. A. A. (2012). La carne de calidad: cuestión de bienestar. *La Ciencia y el Hombre*. XXV: 2-3.
30. Mane B. G., Mendiratta S. K., Tiwari A. K., Bhilegaokar K. N.. (2011). Detection of Adulteration of Meat and Meat Products with Buffalo Meat Employing Polymerase Chain Reaction Assay. *Food Anal*, 5, 296-300.
31. Mas E., Poza J., Ciriza J., Zaragoza P., Osta R., Rodellar C. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *AquaTIC*, 15.
32. Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya s., Shibata K. Yamada J. Shinmura Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51, 143-148.
33. Mondragón C. P. M., Ulloa A. J. (2011). Identificación de alimentos adulterados mediante espectroscopia de infrarojo. *Fuente*, 6.

34. NORMA Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
35. Ochoa A., Rolando F. (2012). Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. Finlay. La Habana, Cuba. 60p.
36. Perera J., Tormo A., García J. (2002). Ingeniería genética: preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. Síntesis. España. 527p.
37. Pierce A. B. (2011). Genética, un enfoque conceptual. Panamericana S.A. Estados Unidos. 726p.
38. Puerta B., Concepción J. (2005). Prácticas de biología molecular. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, CO. 100p.
39. Ranken M.D. (2003). Manual de Industrias de la Carne. Blackwell Science. Madrid. España. 209p.
40. Reglamento Sanitario de los Alimentos. (2000). http://www.sernac.cl/wp-content/uploads/leyes/decreto/ds_977-96_reglamento_alimentos.pdf (consultado Abril 2014).
41. Rodrigo V. R. (2002). Producción de carne bovina de alta calidad en Colombia. Corpoica. Colombia.
42. Sambrook, J., Russel, D. (2001). Molecular Cloning. A laboratory manual. E.U.A, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

43. Sharifah B., Shuhaimi M., Subha B., Uda H. (2013). Canine-Specific PCR Assay Targeting Cytochrome b Gene for the Detection of Dog Meat Adulteration in Commercial Frankfurters. *Food Anal Methods*, 7, 234-241.
44. Savolainen P., Zhang, Y. P., Luo J., Lundeberg J., Leitner T. (2002). Genetic evidence for an east Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298, 1610–1613.
45. SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2010). Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en la Producción de Carne de Ganado Bovino en Confinamiento. http://www.sagarpa.gob.mx/ganadería/Publicaciones/Documents/Manuales_buenas_praticas/manual_bovino.pdf (Consulta Mayo 2014).
46. Tamim V. A. and Gompper M. E. (2009). Dogs *Canis familiaris* as carnivores: their role and function in intraguild competition. *Mammal Rev*, 39, 265–283.
47. Ulca P., Balta H., Çağın İ., Senyuva H. Z. (2013). Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. *Meat science*, 94, 280-284.
48. Westermeier, R. (1997). *Electroforesis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation*. VCH. Weinheim. 399p.
49. Zavala C. J. E. (2005). *Manual de técnicas de biología molecular*. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México. 199p.

ANEXOS

Primers para Bovino (*Bos taurus*).

Frontal: 5'- GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA - 3'

Reverso: 5'- CTA GAA AAG TGT AAG ACC AGT AAT ATA AG -3'

Primers para Cerdo (*Sus scrofa domestica*).

Frontal: 5'- GAC CTC CCA GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCT TGA TGA AA - 3'

Reverso: 5'- GCT GAT AGT AGA TTT GTG ATG ACC GTA -3'

Primers para *Canis lupus familiaris*

Frontal: 5'- CCT TAC TAG GAG TAT GCT TG -3'

Reverso: 5'- TGG GTG ACT GAT GAA AAA G -3'

MITOWEB

MITOMAP MITOMASTER MITOWIKI

Complete Mitochondrial DNA Sequences

The revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) is GenBank number [NC_012920](#)

Please use this new number when citing the rCRS in publications. The rCRS is a reference sequence, not a "consensus" sequence. It is a single reference individual from haplogroup H2a2 and has been used as a standard for reporting variants for over 30 years. See Bandelt's new 2013 rCRS review, link below.

View MITOMAP's fully annotated rCRS sequence [here](#).

The Cambridge Reference Sequence, revised & original:

Version	GenBank #	Fasta format	Article links
Revised Cambridge Reference Sequence ("rCRS") Two identical versions of the rCRS are available in GenBank.	NC_012920 gi:251831106	rCRS-fasta	NEW Bandelt's 2013 rCRS review (PDF) Andrews et al 1999 (PubMed) • Read the paper (PDF)

Dar clic

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=canis+lupus+familiaris+cytb+gene+complete

Esta página está en **inglés** ¿Quieres traducirla? Traducir No Nunca traducir inglés

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide canis lupus familiaris cytb gene complete **Search**

Save search Limits Advanced Help

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Default order

Send to: Filter your results:

Results: 1 to 20 of 276

1. **Canis lupus familiaris cytochrome b (cytb) gene, complete cds, mitochondrial**
 1,140 bp linear DNA
 Accession: JF489119.1 GI: 326632140
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#) [Related Sequences](#)

2. **Canis lupus familiaris mitochondrion, complete genome**
 16,727 bp circular DNA
 Accession: KF907307.1 GI: 577029797
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

3. **Canis lupus familiaris mitochondrion, complete genome**
 16,730 bp circular DNA
 Accession: KF907309.1 GI: 577029811
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

INSDC (GenBank) (273)
 mRNA (0)
 RefSeq (3)

Manage Filters

Top Organisms [Tree]
 Canis lupus familiaris (273)
 Hammondia heydomi (3)

Search details
 ("Canis lupus familiaris"
 [Organism] OR canis lupus

Introducir el nombre de la especie de interés

Elegir la opción más adecuada.

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF489119.1

Nucleotide Nucleotide **Search**

Limits Advanced Help

Display Settings: GenBank

Send: **Change region shown**

Canis lupus familiaris cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial

GenBank: JF489119.1
[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

Go to:

LOCUS JF489119 1140 bp DNA linear MAM 24-FEB-2012
 DEFINITION Canis lupus familiaris cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial.
 ACCESSION JF489119
 VERSION JF489119.1 GI:326632140
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Canis lupus familiaris (dog)
 ORGANISM [Canis lupus familiaris](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia; Canidae; Canis.

Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features
 Find in this Sequence

Articles about the CYTB gene
 Relaxation of selective constraint on dog mitochondrial DNA fr. [Genome Res. 2006]
 Canis species

Sub-sequence or pattern **Find**

Dar clic para que aparezca el buscador de secuencias

www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JF489119.1

/translation="MTNIRKTHPLAKIVNNSFIDLPAFSPNISAWNNFGSLLGVCLILQ
 ILTGLFLAMHYTSDTATAFSSVTHICRDVNYGWIIRYMHANGASMFICFLHVGRGL
 YGGSYVFMETWNIIGIVLLFATMATAFMGYVLPWQMSFWGATVITNLLSAIPYIGTDL
 VENIWGGFSVDKAILTRFFAFHFILPFI IAALAMVHLLFLHETGNNFSGITSDSDKI
 PFHPYITKIDILGALLLLILMSLVLFSPDLLGDPDNYTPANPLNTPPHIKFEWYFLF
 AYAILRSIPNKLGGVLALVFSILILAFIPLLHTSKQRSMFRPLSQCLFWLLVADLLT
 LTIWGGQVVEHFFIIIGQVASILYFTIILLMPTVSVIENLLKWK"

ORIGIN
 1 atgaccaaca ttogaaaaac ccacccoacta gcaaaaattg ttaataacto attcattgac
 61 ctcccagcgc cgtctaacat ctctgcttga tggaaacttg gatccttact aggagatgac
 121 ttgattctac agattctaac aggtttatct ttagtctatgc actatacaatc ggacacagcc
 181 acagcttttt cctcagctcac ccacatctgc cgagacgcta actacggctg aattatccgc
 241 tatatgcaag caaatggcgc ttccatattc tttatctgoc tattctocata tgtaggagca
 301 ggocotattt acggatccta tgtatcota gaaacatgaa acattggaat tgtactatta
 361 ttogcaacca tagccaacagc attcatgggc tagtactac catgaggaca aatatacatt
 421 tgaggagcaa ctgtaatacc taatctctct ctgccaatcc ctatatocg aactgaacta
 481 gtagaatgaa tctgaggcgc cttctcagtg gacaaagcaa cctaacaacg attctttgca
 541 ttccatttca tctctccttt cctcctcctc cctcctcctc cctcctcctc cctattttca
 601 cagcaaacgc gatccaacaa cctctcagga atcacatcag actcagacaa aattccattt
 661 cacccttact acacaatcaa ggataccta ggagccttac tctactcctc aatcctaata
 721 tcaactagttt tattttcacc tgacctaacta ggagacccaag ataactacac cctgcacaac
 781 cccctaataca cccctccaca tattaaacct gactgatatt ttctattcgc ctatgctatc
 841 ctacgatcca ttocctaataa attaggaggt gtaactgccc tagtattctc catcctaacc
 901 ttggcaatca ttocactcct ccacacatct aagcaacgca gataaattat cgggcccctt
 961 agccaatgcc tattctgact tttagtgcgc gatctctcca ctttaacatg aattggagga
 1021 caaccagttg aacacccctt cctcattatc ggacaagtgc cttaactctt atatttcaac
 1081 atctttatga tcttaatacc aacagttagc gttatcgaaa acaacctctc aaaaagaaga

Recent activity

Canis lupus familiaris CYTB gene, partial sequence; and cyto[...]
 canis lupus familiaris cytb gene (404)
 canis lupus familiaris mitochondrial (290012)

Find: ccttactaggagatgcttg 1 of 1 JF489119 : 104-123

Introducir la secuencia del primer frontal

Indica la posición de la secuencia en el gen.

www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JF489119.1

/translation="MTNIRKTHPLAKIVNNSFIDLPAFSPNISAWNNFGSLLGVCLILQ
 ILTGLFLAMHYTSDTATAFSSVTHICRDVNYGWIIRYMHANGASMFICFLHVGRGL
 YGGSYVFMETWNIIGIVLLFATMATAFMGYVLPWQMSFWGATVITNLLSAIPYIGTDL
 VENIWGGFSVDKAILTRFFAFHFILPFI IAALAMVHLLFLHETGNNFSGITSDSDKI
 PFHPYITKIDILGALLLLILMSLVLFSPDLLGDPDNYTPANPLNTPPHIKFEWYFLF
 AYAILRSIPNKLGGVLALVFSILILAFIPLLHTSKQRSMFRPLSQCLFWLLVADLLT
 LTIWGGQVVEHFFIIIGQVASILYFTIILLMPTVSVIENLLKWK"

ORIGIN
 1 atgaccaaca ttogaaaaac ccacccoacta gcaaaaattg ttaataacto attcattgac
 61 ctcccagcgc cgtctaacat ctctgcttga tggaaacttg gatccttact aggagatgac
 121 ttgattctac agattctaac aggtttatct ttagtctatgc actatacaatc ggacacagcc
 181 acagcttttt cctcagctcac ccacatctgc cgagacgcta actacggctg aattatccgc
 241 tatatgcaag caaatggcgc ttccatattc tttatctgoc tattctocata tgtaggagca
 301 ggocotattt acggatccta tgtatcota gaaacatgaa acattggaat tgtactatta
 361 ttogcaacca tagccaacagc attcatgggc tagtactac catgaggaca aatatacatt
 421 tgaggagcaa ctgtaatacc taatctctct ctgccaatcc ctatatocg aactgaacta
 481 gtagaatgaa tctgaggcgc cttctcagtg gacaaagcaa cctaacaacg attctttgca
 541 ttccatttca tctctccttt cctcctcctc cctcctcctc cctcctcctc cctattttca
 601 cagcaaacgc gatccaacaa cctctcagga atcacatcag actcagacaa aattccattt
 661 cacccttact acacaatcaa ggataccta ggagccttac tctactcctc aatcctaata
 721 tcaactagttt tattttcacc tgacctaacta ggagacccaag ataactacac cctgcacaac
 781 cccctaataca cccctccaca tattaaacct gactgatatt ttctattcgc ctatgctatc
 841 ctacgatcca ttocctaataa attaggaggt gtaactgccc tagtattctc catcctaacc
 901 ttggcaatca ttocactcct ccacacatct aagcaacgca gataaattat cgggcccctt
 961 agccaatgcc tattctgact tttagtgcgc gatctctcca ctttaacatg aattggagga
 1021 caaccagttg aacacccctt cctcattatc ggacaagtgc cttaactctt atatttcaac
 1081 atctttatga tcttaatacc aacagttagc gttatcgaaa acaacctctc aaaaagaaga

Recent activity

Canis lupus familiaris cytochrome b (cytb) gene, complete cds; Nucleotide
 canis lupus familiaris cytb gene complete (276)
 canis lupus familiaris cytb gene (404)
 canis lupus familiaris mitochondrial (290012)

Find: cttttcatcagtcacca 1 of 1 JF489119 : 185-203

Introducir la secuencia del primer reverso