

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos



**UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS GENÉTICAS (PCR Y PCR
CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL) E
INMUNOLÓGICAS (ELISA), PARA LA DETECCIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE DIFERENTES ESPECIES
ANIMALES EN *FOIE GRAS***

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Miguel Ángel Rodríguez Ramos

Bajo la dirección de las Doctoras:

María del Rosario Martín de Santos
Teresa García Lacarra

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2689-5

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



**UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS GENÉTICAS (PCR Y PCR
CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL) E INMUNOLÓGICAS
(ELISA), PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
DIFERENTES ESPECIES ANIMALES EN *FOIE GRAS***

TESIS DOCTORAL

MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ RAMOS

Madrid, 2004

ÍNDICE

I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR.....	1
II. INTRODUCCIÓN	6
II.1. EL FOIE GRAS	7
II.1.1. ESPECIES Y RAZAS EMPLEADAS EN LA PRODUCCIÓN DE FOIE GRAS.....	8
II.1.2. CICLO DE PRODUCCIÓN DE LAS PALMÍPEDAS GRASAS.....	11
II.1.2.1. PERIODO DE ARRANQUE.....	12
II.1.2.2. PERIODO DE CRECIMIENTO.....	12
II.1.2.3. PERIODO DE EMBUCHADO O CEBO.....	13
II.1.3. PRODUCTOS ELABORADOS A PARTIR DEL FOIE GRAS.....	14
II.1.4. COMERCIALIZACIÓN.....	19
II.2. TÉCNICAS BASADAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	27
II.2.1. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS	28
II.2.1.1. ISOELECTROENFOQUE (IEF).....	29
II.2.1.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE)	31
II.2.1.3. ELECTROFORESIS CAPILAR (EC).....	32
II.2.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	33
II.2.3. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	35
II.2.3.1. INMUNODIFUSIÓN EN GELES DE AGAR.....	35
II.2.3.2. INMUNOELECTROFORESIS.....	36
II.2.3.3. TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA).....	37
II.3. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES ANIMALES BASADAS EN EL ADN	43
II.3.1. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP).....	48
II.3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	49
II.3.3. SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS POR PCR.....	55

II.3.4. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE REGIONES AMPLIFICADAS POR PCR (PCR-RFLP).....	58
II.3.5. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA CONFORMACIÓN DE LAS CADENAS SENCILLAS DE ADN DE REGIONES AMPLIFICADAS POR PCR (PCR-SSCP).....	62
II.3.6. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DEL ADN AMPLIFICADO CON CEBADORES ARBITRARIOS (RAPD)	65
II.3.7. PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL.....	68
II.3.7.1. SISTEMAS DE PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL: DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN.....	68
II.3.7.1.1. Empleo de un programa informático adecuado para el diseño de los cebadores y de la sonda.....	69
II.3.7.1.2. Selección del tipo de molécula marcadora para el ensayo de PCR cuantitativo.....	72
II.3.7.1.3. Establecimiento de los parámetros empleados en el termociclador.....	80
II.3.7.1.4. Optimización de la concentración de cebadores y sonda.....	81
II.3.7.2. CUANTIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL.....	82
II.3.7.3. INSTRUMENTACIÓN.....	86
II.3.7.4. APLICACIONES.....	88
III. MATERIAL Y MÉTODOS	90
III.1. MATERIAL.....	91
III.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	91
III.1.1.1. MUESTRAS DE FOIE GRAS Y DE CARNE.....	91
III.1.1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	91
III.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO	91
III.1.3. PRODUCTOS Y REACTIVOS	94
III.2. METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL DESARROLLO DE LAS TÉCNICAS GENÉTICAS	94
III.2.1. SELECCIÓN DE MARCADORES GÉNICOS	94

III.2.2. SELECCIÓN Y DISEÑO DE CEBADORES	96
<i>III.2.2.1. CEBADORES DEL GEN NUCLEAR 5S ADN_r</i>	96
<i>III.2.2.2. CEBADORES DEL GEN NUCLEAR α-ACTINA</i>	98
<i>III.2.2.3. CEBADORES DEL GEN MITOCONDRIAL 12S ARN_r</i>	99
III.2.3. EXTRACCIÓN DEL ADN	101
<i>III.2.3.1. MÉTODO DE DESALLE Y COL., (1993)</i>	101
<i>III.2.3.2. MÉTODO DE DESALLE Y COL., (1993) MODIFICADO</i>	103
<i>III.2.3.3. MÉTODO WIZARD[®] MAGNETIC DNA PURIFICATION SYSTEM FOR FOOD</i>	103
<i>III.2.3.4. MÉTODO WIZARD[®] DNA CLEAN-UP</i>	105
III.2.4. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DEL ADN	106
<i>III.2.4.1. INTEGRIDAD DEL ADN</i>	106
<i>III.2.4.2. PUREZA DEL ADN</i>	108
<i>III.2.4.3. CONCENTRACIÓN DEL ADN</i>	108
III.2.5. AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES GÉNICOS SELECCIONADOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	109
<i>III.2.5.1. GEN NUCLEAR 5S ADN_r</i>	110
III.2.5.1.1. Cebadores 5S1 y 5S2	110
III.2.5.1.2. Cebadores 5S3, 5SG y 5SD	112
<i>III.2.5.2. GEN NUCLEAR α-ACTINA</i>	112
III.2.5.2.1. Cebadores actinv, ActG, ActD, ActC y ActP.....	113
<i>III.2.5.3. GEN MITOCONDRIAL 12S ARN_r</i>	113
III.2.5.3.1. Cebadores 12SFW/12SREV y 12SFWM/ 12SSEQ.....	113
III.2.5.3.2. Cebadores 12SFW, 12SG, 12SD, 12SC, 12ST y 12SP	114
III.2.5.3.3. Cebadores 12SFWM, 12SBT, 12SOA, 12SCH y 12SP.....	114
III.2.6. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LOS PRODUCTOS DE PCR.	115
<i>III.2.6.1. TAMPONES, GELES Y SOLUCIONES EMPLEADAS</i>	115
<i>III.2.6.2. PREPARACIÓN DEL GEL</i>	116

III.2.6.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	117
III.2.6.4. CONDICIONES DE SEPARACIÓN	117
III.2.7. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS POR PCR	118
III.2.7.1. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	118
III.2.7.2. CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	120
III.2.7.2.1. Ligación de los productos de PCR	123
III.2.7.2.2. Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	124
III.2.7.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las colonias transformadas	126
III.2.7.3. PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO.....	127
III.2.7.4. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR PURIFICADOS.....	128
III.2.8. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE ADN	129
III.2.9. TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL.....	130
III.2.9.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	131
III.2.9.2. EXTRACCIÓN DEL ADN.....	132
III.2.9.3. DISEÑO DE CEBADORES Y SONDAS.....	132
III.2.9.3.1. Cuantificación de ADN de pato en mezclas binarias pato/oca.....	132
III.2.9.3.2. Cuantificación de ADN de cerdo en mezclas binarias cerdo/vaca.....	134
III.2.9.4. AMPLIFICACIÓN POR PCR.....	134
III.2.9.4.1. Cuantificación de ADN de pato en mezclas binarias pato/oca.....	134
III.2.9.4.2. Cuantificación de ADN de cerdo en mezclas binarias cerdo/vaca.....	136
III.2.9.5. PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO PARA LA ELABORACIÓN DE LA RECTA ESTÁNDAR.....	136
III.2.9.5.1. Cuantificación de ADN de pato en mezclas binarias pato/oca.....	136
III.2.9.5.2. Cuantificación de ADN de cerdo en mezclas binarias cerdo/vaca.....	137

III.2.9.6. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	138
III.2.9.6.1. Cuantificación de ADN de pato en mezclas binarias pato/oca.....	138
III.2.9.6.2. Cuantificación de ADN de cerdo en mezclas binarias cerdo/vaca.....	140
III.3. METODOLOGÍA UTILIZADA PARA EL DESARROLLO DE LAS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.....	141
III.3.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS	142
III.3.2. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES	142
III.3.2.1. PAUTA DE INMUNIZACIÓN Y OBTENCIÓN DE INMUNOSUEROS	143
III.3.3. TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN PLACA.....	145
III.3.4. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES.....	147
III.3.4.1. PROPAGACIÓN DE LA GENOTECA.....	152
III.3.4.2. SELECCIÓN DE LA GENOTECA.....	154
III.3.4.3. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD Y AFINIDAD DE LOS CLONES POSITIVOS MEDIANTE UNA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO	156
III.3.4.3.1. Identificación de fagos “Policlonales”.....	157
III.3.4.3.2. Identificación de fagos “Monoclonales”.....	157
III.3.4.4. PRODUCCIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS (scFv) SOLUBLES	158
IV. RESULTADOS	159
IV.1. IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE OCA, PATO, POLLO, PAVO, CERDO, VACA, OVEJA y CABRA	160
IV.1.1. SELECCIÓN DE MARCADORES GÉNICOS Y DISEÑO DE CEBADORES	160
IV.1.1.1. GEN NUCLEAR 5S ADN _r	160
IV.1.1.2. GEN NUCLEAR α -ACTINA	161
IV.1.1.3. GEN MITOCONDRIAL 12S ARN _r	161
IV.1.2. EXTRACCIÓN DEL ADN.....	162
IV.1.3. ANÁLISIS DE LOS MARCADORES SELECCIONADOS MEDIANTE DIVERSAS TÉCNICAS GENÉTICAS	164

IV.1.3.1. GEN 5S ADNr.....	164
IV.1.3.1.1. Amplificación por PCR y secuenciación	164
IV.1.3.2. GEN α -ACTINA	167
IV.1.3.2.1. Amplificación por PCR y secuenciación	167
IV.1.3.2.2. Diseño de cebadores específicos y amplificación de fragmentos específicos de especie	172
IV.1.3.2.3. Determinación del límite de detección	178
IV.1.3.3. GEN 12S ARNr.....	181
IV.1.3.3.1. Amplificación por PCR y secuenciación	181
IV.1.3.3.2. Diseño de cebadores específicos y amplificación de fragmentos específicos de especie	186
IV.1.3.3.2.1. Cebadores 12SFW, 12SG, 12SD, 12SC, 12ST y 12SP.....	186
IV.1.3.3.2.2. Cebadores 12SFWM, 12SBT, 12SOA, 12SCH y 12SP.....	188
IV.1.3.3.3. Determinación del límite de detección en mezclas binarias experimentales.....	188
IV.1.3.3.3.1. Mezclas binarias experimentales de oca, pato, pollo, pavo y cerdo....	188
IV.1.3.3.3.2. Mezclas binarias experimentales de vaca, oveja, cabra y cerdo.....	193
IV.1.3.4. TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL.....	197
IV.1.3.4.1. Cuantificación de ADN de pato en mezclas de foie gras pato/oca.....	197
IV.1.3.4.2. Cuantificación de ADN de cerdo en mezclas binarias cerdo/vaca.....	205
IV.2. IDENTIFICACIÓN INMUNOLÓGICA DE OCA y PATO	214
IV.2.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS	214
IV.2.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES	215
IV.2.2.1. ELISA INDIRECTO EN PLACA.....	216
IV.2.3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES	216
IV.2.3.1. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD Y AFINIDAD DE LOS CLONES POSITIVOS MEDIANTE UNA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO	218

V. DISCUSIÓN	219
V.I. IDENTIFICACIÓN DE OCA, PATO, POLLO, PAVO, CERDO, VACA, OVEJA y CABRA MEDIANTE TÉCNICAS GENÉTICAS	220
V.1.1. SELECCIÓN DE MARCADORES GÉNICOS	222
V.1.2. SELECCIÓN Y DISEÑO DE LOS CEBADORES	224
V.1.3. EXTRACCIÓN DEL ADN	227
V.1.4. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	230
V.1.5. TÉCNICA DE PCR UTILIZANDO EL GEN 5S ADNr	232
V.1.6. TÉCNICA DE PCR UTILIZANDO EL GEN DE α -ACTINA.....	236
V.1.7. TÉCNICA DE PCR UTILIZANDO EL GEN 12S ARNr	240
V.1.8. TÉCNICA DE PCR-CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL	243
V.1.8.1. CUANTIFICACIÓN DE ADN DE PATO EN MEZCLAS BINARIAS PATO/OCA.....	246
V.1.8.2. CUANTIFICACIÓN DE ADN DE CERDO EN MEZCLAS BINARIAS CERDO/VACA.....	247
V.1.8.3. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL.....	249
V.2. IDENTIFICACIÓN DE OCA Y PATO MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	251
V.2.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES	252
V.2.1.1. VALORACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES.....	254
V.2.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES	256
VI. CONCLUSIONES	260
VII. TRABAJO FUTURO	262
VIII. BIBLIOGRAFÍA	266
IX. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	301
X. GLOSARIO DE NOMBRES CIENTÍFICOS	312
XI. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	315

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



**UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS GENÉTICAS (PCR Y PCR
CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL) E INMUNOLÓGICAS
(ELISA), PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
DIFERENTES ESPECIES ANIMALES EN *FOIE GRAS***

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA
DE LOS ALIMENTOS
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Memoria que para optar al grado de
Doctor presenta el Licenciado Miguel
Ángel Rodríguez Ramos

Madrid, marzo 2004



Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 37 50. Fax: 91 394 37 43

M^a DEL ROSARIO MARTÍN DE SANTOS (*Catedrática de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*) y **TERESA GARCÍA LACARRA** (*Profesora Titular de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*),

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Utilización de técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (ELISA), para la detección y cuantificación de diferentes especies animales en foie gras**”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria Miguel Ángel Rodríguez Ramos, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección conjunta, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Madrid, marzo de 2004

Fdo: Rosario Martín de Santos

Fdo: Teresa García Lacarra

*Llamamos destino a todo cuanto
limita nuestro poder.*

Ralph Waldo Emerson

*No es el pasado lo que forma
nuestro presente, sino el
presente lo que da significado a
nuestro pasado.*

Alan Watts

A Cristina

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas y entidades que han colaborado directa o indirectamente en la realización de esta Tesis Doctoral, en particular:

Muy especialmente, a mis directoras de tesis, las doctoras Rosario Martín de Santos y Teresa García Lacarra, por el enorme compromiso adquirido en la realización de esta tesis. Además, quiero agradecerles la paciencia y dedicación que me han brindado en todo momento, así como los valiosos consejos y orientaciones que espero hagan de mi una mejor persona.

Mi más sincero agradecimiento a todos y cada uno de los Profesores de este Departamento, por su generosidad y ayuda desinteresada siempre que lo he necesitado; en especial a Isabel González, María Marín, Juan Miguel Rodríguez y Pablo E. Hernández. También, al personal del Departamento, Aurora, Santiago y Alberto, por su ayuda durante la realización de la tesis.

Al Proyecto AGL2001-1381, concedido por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología y a la Comunidad Autónoma de Madrid por las becas recibidas dentro del Plan de Formación de Profesorado y de Personal Investigador. A los Profesores Dr. Juan Antonio Ordoñez Pereda y Dr. Lorenzo de la Hoz Perales, Directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por darme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en este Departamento.

A mi amigo Luis Asensio, por todos estos años de buenos momentos que hemos compartido en el laboratorio, por estar siempre disponible cuando te he necesitado, y por fomentar en mi un espíritu combativo y de superación ante los problemas que he encontrado. Muchas gracias.

También quiero darle las gracias a la gente que me ayudó en los “primeros pasos” en el laboratorio: las doctoras Ana Céspedes, Esther Carrera, y en especial Alicia Fernández, por tu paciencia y por tantas enseñanzas bien recibidas. Y a todas las compañeras que he ido encontrando desde entonces en el grupo de investigación: Esther, Inés, Belén, Amanda, Irene y Violeta.

A todos y cada uno de los becarios de este Departamento, en especial a María Martín y Raquel Criado por los buenos ratos que hemos pasado en “nuestras charlas”, y también a

Toni, Susana Langa, Juliana, Belén Orgaz, Rosanna, Rocío, Susana Manzano, Carlos, Bea, Jorge, Antonio, Mati, Esther, Conchita, Raquel.... por enriquecerme y permitirme hacerme llevar el día a día más divertido y ameno.

Quisiera agradecer a los miembros del Departamento de Tecnología y Química de los Alimentos de la Universidad de Graz (Austria) por permitirme disfrutar de una estancia maravillosa. En especial, dar las gracias al Dr. Peter Remler por tantas enseñanzas y por brindarme su ayuda en los momentos difíciles. También a los miembros del Departamento de Biología Molecular y Celular de la Universidad de Aberdeen (Escocia) y en especial a los doctores Andy Porter y Keith Charlton, por sus enriquecedores consejos. Además quisiera dar las gracias a toda la gente que conocí allí, por hacer de mi estancia en Aberdeen una experiencia inolvidable: Carmen, Matt, Ian, Gill, Henry, Struan, etc...

También agradecer a mis amigos Robert, Dani y Santi su facilidad para escucharme, apoyarme y darme ánimos en todo momento.

Y finalmente, mi agradecimiento "más especial". Quisiera dar las gracias de todo corazón a todos los que me ayudan y quieren diariamente, a los que me cuidan, a los que me miman, a los que me consienten, a los que me enseñan, a los que me animan, a los que piensan en mi, a los que me soportan, a los que me sufren, a los que me aman, y a los que no voy a hacer justicia sólo con unas pocas líneas de cariño. A mi familia, que no ha dejado de creer en mi y confía ciegamente en mis posibilidades para lograr siempre lo que me proponga, en especial a mis padres y hermanos a los que debo gratitud infinita, y a mi mujer, Cristina, que es para mi un ejemplo de autenticidad y me aporta cada día la alegría y el amor que me completan y me mejoran. No se si algún día podré devolveros todo lo que habéis hecho y hacéis diariamente por mi, aunque ya sabéis que me esfuerzo en intentarlo.... ¡No cambiéis nunca! ¡Os quiero!

CAPÍTULO I

**EXPOSICIÓN GENERAL DEL
PROBLEMA A INVESTIGAR**

En el mercado del *foie gras* y sus derivados se incluyen una gran variedad de productos que difieren en calidad y precio. Los que alcanzan mayor valor económico son los elaborados exclusivamente a partir de *foie gras* de oca o pato, que se clasifican en: “*foie gras entero de oca (o pato)*”, “*foie gras de oca (o pato)*”, “*bloque de foie gras de oca (o pato)*” y “*parfait de foie gras de oca (y/o pato)*”. El único producto de *foie gras* de primera categoría donde se permite la mezcla de hígados de oca y pato es el parfait. Actualmente, al tiempo que se observa un incremento en la exportación y en el número de consumidores de *foie gras* (Pé, 1997), están apareciendo prácticas fraudulentas con la finalidad de modificar la textura del producto obtenido o disminuir su coste de fabricación, mediante la adición de hígados frescos de especies más baratas como el pollo, pavo o cerdo (Hemmen y col., 1993). El *foie gras* de oca, debido a su elevado precio, popularidad y demanda, es el más susceptible de sustitución utilizando hígado o carne de especies animales menos valoradas (JORF, 1993). Por otra parte, la incorporación de pato al *foie gras* de oca, no sólo proporciona al fabricante mayor beneficio económico al venderlo fraudulentamente como oca, sino que además ayuda a resolver problemas técnicos debidos al bajo punto de fusión de los productos de oca.

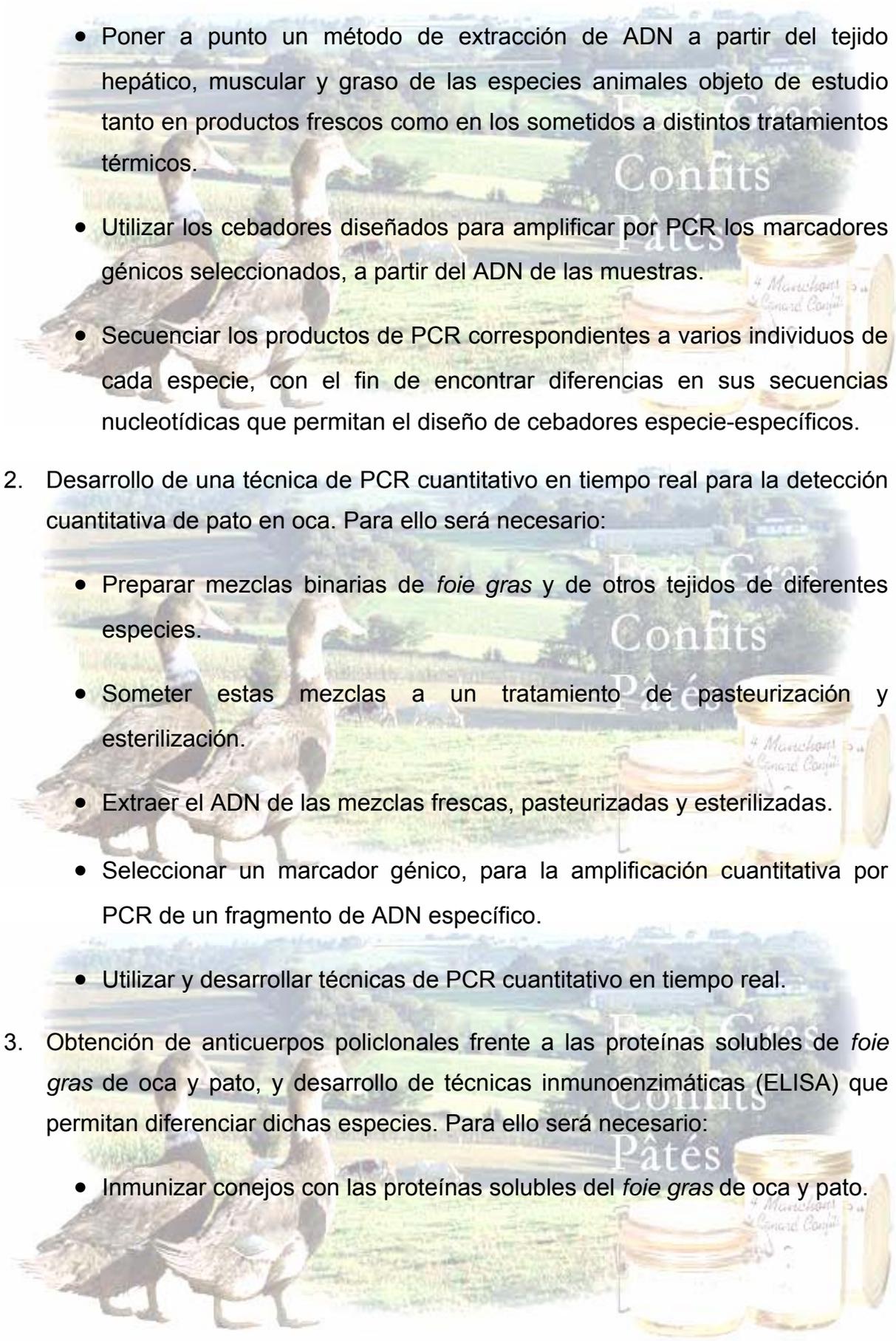
Los métodos empleados para la identificación de especies animales en productos cárnicos frescos o procesados, incluyen técnicas basadas en el análisis de las proteínas como las técnicas electroforéticas (Ozgen Arun y Ugur, 2000; Bellis y col., 2003; Renon y col., 2003), cromatográficas (Toorop y col., 1997a, 1997b) e inmunológicas (Martin y col., 1998; Chen y Hsieh, 2000; Chen y col., 2002; Hajmeer y col., 2003) y técnicas basadas en el análisis de los ácidos nucleicos (ADN o ARN) o técnicas genéticas (Colombo y col., 2002a; Hird y col., 2003).

Las principales ventajas de las técnicas genéticas cuando se comparan con las basadas en el análisis de proteínas son: a) el ADN es una molécula bastante estable, que permite el análisis de alimentos que han sido procesados o sometidos a tratamientos térmicos (Unselde y col., 1995); b) el ADN contiene mayor información genética que las proteínas debido a la degeneración del código genético, y c) el resultado del análisis no depende del tejido analizado, puesto que todas las células del organismo poseen la misma información genética.

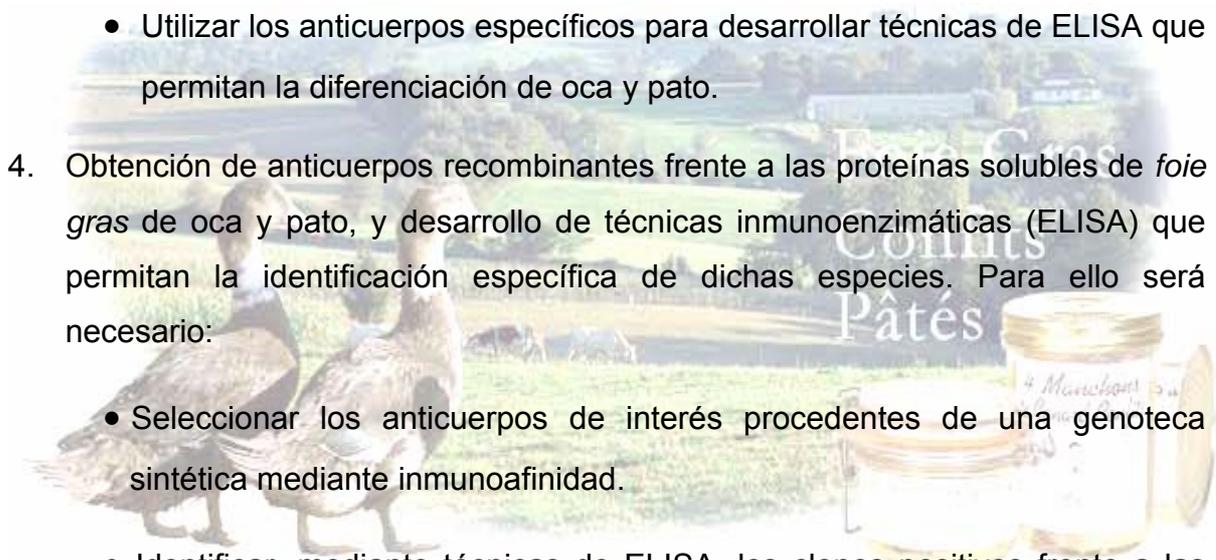
La identificación de la especie de origen en *foie gras* y sus derivados se realiza habitualmente atendiendo a las características anatómicas de los hígados y a diferencias organolépticas relacionadas con la apariencia, textura y aroma (Rousset y col., 1993, 1994). Sin embargo, la identificación por criterios anatómicos sólo es aplicable cuando se dispone de hígados, o al menos de lóbulos intactos y requiere profesionales muy cualificados para llevarla a cabo. Teniendo en cuenta que muchos de estos productos se someten a procesos tecnológicos que desnaturalizan las proteínas, las técnicas de PCR constituyen una de las alternativas actuales más específicas para llevar a cabo su caracterización (Rodríguez y col., 2001, 2003a, 2003b, 2003c). Las técnicas de PCR convencionales permiten la detección cualitativa de distintas especies animales en una mezcla; pero para cuantificar el porcentaje de incorporación de una especie en un producto, es necesario emplear técnicas de PCR cuantitativo. Actualmente, son escasas las aplicaciones de la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real para la identificación de especies en alimentos destinados al consumo humano (Brodmann y Moor, 2003; Rehbein y Horstkotte, 2003; Sawyer y col., 2003; Sotelo y col., 2003; Walker y col., 2003, 2004).

Por tanto, la puesta a punto de métodos de análisis eficaces, rápidos y baratos que permitiesen la identificación de diferentes especies animales en *foie gras*, tendría un gran interés en la detección de los productos etiquetados incorrectamente y permitiría ofrecer una mayor protección a empresas de importación y exportación, industrias de transformación y consumidores. Por todo lo expuesto, en este trabajo se plantea la utilización de diversas técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (ELISA), para la detección y cuantificación de diferentes especies animales en *foie gras*. Los objetivos que se pretenden conseguir son los siguientes:

1. Selección de marcadores génicos y utilización de técnicas de PCR para obtener perfiles característicos que permitan la diferenciación de las especies habitualmente empleadas en la producción de *foie gras*, así como de otras especies que puedan incorporarse fraudulentamente a estos productos. Para ello será necesario:

- 
- Seleccionar marcadores génicos y diseñar cebadores que permitan su amplificación por PCR.
 - Poner a punto un método de extracción de ADN a partir del tejido hepático, muscular y graso de las especies animales objeto de estudio tanto en productos frescos como en los sometidos a distintos tratamientos térmicos.
 - Utilizar los cebadores diseñados para amplificar por PCR los marcadores génicos seleccionados, a partir del ADN de las muestras.
 - Secuenciar los productos de PCR correspondientes a varios individuos de cada especie, con el fin de encontrar diferencias en sus secuencias nucleotídicas que permitan el diseño de cebadores especie-específicos.
2. Desarrollo de una técnica de PCR cuantitativo en tiempo real para la detección cuantitativa de pato en oca. Para ello será necesario:
- Preparar mezclas binarias de *foie gras* y de otros tejidos de diferentes especies.
 - Someter estas mezclas a un tratamiento de pasteurización y esterilización.
 - Extraer el ADN de las mezclas frescas, pasteurizadas y esterilizadas.
 - Seleccionar un marcador génico, para la amplificación cuantitativa por PCR de un fragmento de ADN específico.
 - Utilizar y desarrollar técnicas de PCR cuantitativo en tiempo real.
3. Obtención de anticuerpos policlonales frente a las proteínas solubles de *foie gras* de oca y pato, y desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) que permitan diferenciar dichas especies. Para ello será necesario:
- Inmunizar conejos con las proteínas solubles del *foie gras* de oca y pato.

- Obtener anticuerpos especie-específicos a partir de los inmunoseros obtenidos tras el proceso de inmunización.
 - Utilizar los anticuerpos específicos para desarrollar técnicas de ELISA que permitan la diferenciación de oca y pato.
4. Obtención de anticuerpos recombinantes frente a las proteínas solubles de *foie gras* de oca y pato, y desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) que permitan la identificación específica de dichas especies. Para ello será necesario:
- Seleccionar los anticuerpos de interés procedentes de una genoteca sintética mediante inmunoafinidad.
 - Identificar, mediante técnicas de ELISA, los clones positivos frente a las especies citadas.
 - Utilizar los anticuerpos recombinantes para desarrollar técnicas de ELISA que permitan la diferenciación de oca y pato.



CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

II.1. EL FOIE GRAS

El *foie gras* es un alimento exquisito, resultado de una tradición milenaria, que se obtiene mediante el cebamiento artesanal de palmípedas grasas.

Ya en el siglo III a.C., los egipcios practicaban el cebado de las ocas, valiéndose de la capacidad que tienen ciertas aves, entre ellas patos y ocas, de ingerir grandes cantidades de alimentos y así almacenar importantes reservas energéticas en forma de grasas y azúcares antes del inicio de sus largas migraciones (Blum, 1997). Los hebreos transmitieron esta tradición al mundo greco-latino y existen múltiples escritos que hacen referencia al prestigio del que gozaba el hígado de ocas cebadas con higos (*jecur ficatum*) en la sociedad romana. De hecho, la palabra hígado y sus equivalentes en francés (*foie*) e italiano (*fegato*) tienen su origen en el vocablo latino *ficatum* (higo).

Desde la caída del Imperio Romano hasta la Edad Media, no se encuentran referencias relativas al *foie gras*, pero es posible que la tradición en el consumo de este producto se mantuviera en Europa gracias a algunas comunidades judías.

No obstante, no fue hasta la segunda mitad del siglo XVIII, cuando se potenció, en el suroeste francés, la producción del *foie gras* tal y como hoy lo conocemos. Este impulso se debió principalmente a la mejora de los métodos de cría y cebado de los patos y ocas, así como a la utilización de patos híbridos especialmente adaptados a la producción de *foie gras*. En las últimas décadas, se han producido avances importantes en los métodos de producción y en la tecnología de procesado del *foie gras* y sus derivados mediante tratamientos térmicos, envasado aséptico y otros procedimientos que garantizan la calidad higiénico-sanitaria del producto y su conservación durante periodos prolongados.

Francia es el principal productor y transformador de *foie gras* del mundo, además de su mayor consumidor (Pé, 1997). El incremento en la exportación y la variedad de productos derivados de oca y/o pato presentes en el mercado están potenciando el sector y facilitando el acercamiento de estos alimentos al consumidor. Sin embargo, a medida que se incrementa la demanda, los intentos de fraude (principalmente sustitución fraudulenta de especies) son más comunes, ya que el valor económico del hígado graso de oca es superior al de pato. Por ello, la

búsqueda de métodos analíticos que permitan identificar la especie de procedencia es imprescindible para detectar y evitar el fraude, especialmente en aquellos productos triturados y sometidos a tratamiento térmico en los que la identificación morfológica y organoléptica es más difícil.

II.1.1. ESPECIES Y RAZAS EMPLEADAS EN LA PRODUCCIÓN DE *FOIE GRAS*

Para la producción de *foie gras* se emplean un grupo de aves, pertenecientes al suborden de las anseroideas, familia anátidos (*Figura 1*), que presentan la particularidad de conservar sus caracteres migratorios salvajes, a pesar de la selección genética a la que han sido sometidas. Las más empleadas son:

- **Patos:**

- *Pato de Berbería (Cairina muschata) (Figura 2A)*

- *Pato cruzado o "mulard":* híbrido obtenido del cruzamiento entre una hembra de pato común (*Anas platyrhynchos*) denominada Pekín (*Figura 2B*) y un macho de variedad Berbería (*Cairina muschata*) (*Figura 3*).

El pato de Berbería, también llamado pato mudo, tiene su origen en América del Sur, y es la única especie de pato doméstico que no deriva del ánade real o pato Mallard (*Anas platyrhynchos*). Su coloración original (en estado salvaje) es blanca y negra, pero como consecuencia de la domesticación se han conseguido distintas tonalidades, que incluyen el blanco, negro, marrón y azul. Sobre el pico y alrededor de los ojos presentan carúnculas rojas características para su identificación. Las hembras de esta raza crecen mucho más lentamente que los machos (sólo alcanzan el 60% del tamaño del macho a la edad de comercialización) y su producción de huevos es baja (unos 60 huevos/año). Esta especie se explota principalmente por la calidad de su carne poco grasa, aunque también se puede cebar, proporcionando un *foie gras* de un aroma característico.

El pato cruzado es un híbrido estéril especialmente valioso para la producción de *foie gras* y carne. Al contrario que el pato de Berbería no presenta disparidad en el tamaño entre los sexos. Además, las hembras del pato común (madre del pato cruzado) pueden llegar a producir 250 huevos al año y se adaptan bien a la inseminación artificial.

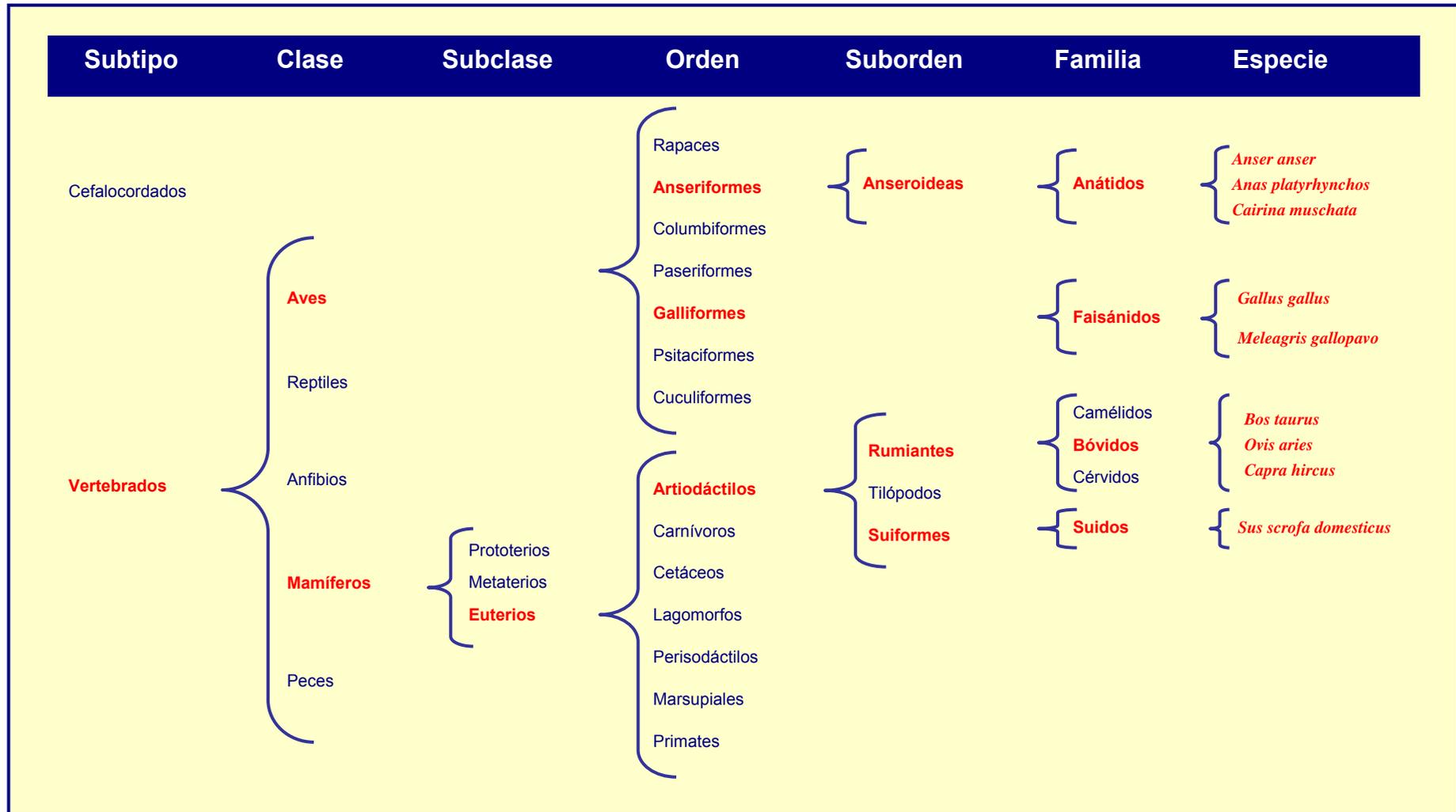


Figura 1. Clasificación taxonómica de pato mulard (*Anas platyrhynchos* x *Cairina muschata*), oca (*Anser anser*), pollo (*Gallus gallus*), pavo (*Meleagris gallopavo*), cerdo (*Sus scrofa domesticus*), vaca (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*) y cabra (*Capra hircus*).



Figura 2. 2A) Pato Berbería (*Cairina muschata*). 2B) Hembras de pato Mallard (variedad Pekín) (*Anas platyrhynchos*).



Figura 3. Pato mulard (*Anas platyrhynchos* x *Cairina muschata*).

Mediante esta práctica se ha conseguido mejorar hasta el 70% la tasa de fecundación de los huevos, que es sólo del 30% mediante cruce natural entre macho Berbería y hembra Mallard.

Estas dos razones hacen que la producción del pato de Berbería resulte más costosa que la del pato cruzado.

El pato cruzado reúne las características más notables de sus dos progenitores:

- Es un animal tranquilo y de fácil manejo.
- Resistente a muchas enfermedades.
- Tiene una carne de buena calidad (no excesivamente grasa).
- Los machos, que son los que se emplean para la producción de *foie gras*, son totalmente mudos.
- Los machos y las hembras son de tamaños parecidos.

• **Ocas o gansos:**

- *Oca de las Landas (Anser anser) (Figura 4):* Variedad seleccionada para la producción de *foie gras* a partir del cruzamiento de razas autóctonas de la especie *Anser anser*. Otras razas, como la oca de Polonia, son más adecuadas para la producción de carne que para la de *foie gras*.

Se emplea el nombre de oca cuando el animal se encuentra en estado doméstico, y la calificación de ganso se reserva para el estado salvaje.

II.1.2. CICLO DE PRODUCCIÓN DE LAS PALMÍPEDAS GRASAS

Tanto en el pato cruzado como en la oca, el periodo de cría para la obtención de *foie gras* puede dividirse en 3 fases: iniciación, crecimiento y cebo. La duración y condiciones de manejo de cada una de las fases puede variar y conviene adaptarlos a cada explotación en particular, por lo que a continuación se indican unas pautas genéricas.



Figura 4. Oca de las Landas.

II.1.2.1. PERIODO DE ARRANQUE

Comprende desde el nacimiento del animal hasta los 21-28 días de vida. En esta primera fase es importante disponer de unas condiciones ambientales (temperatura, humedad, ventilación, iluminación) controladas y unas pautas de manejo adecuadas para conseguir la homogeneidad del lote, que es lo que se persigue a lo largo de todo el ciclo de producción.

II.1.2.2. PERIODO DE CRECIMIENTO

Abarca un periodo de 8-9 semanas de vida del animal según se haga o no fase de preembuchado. Esta fase se desarrolla en parques al aire libre dotados de refugios para las aves.

Se pretende conseguir un animal con un perfecto estado físico y con un desarrollo muscular y esquelético adecuado para obtener un hígado graso de alta calidad. Al comienzo de este periodo los animales disponen de alimento a voluntad (“*ad libitum*”) ya que entre la 3ª y la 7ª semana de vida se produce el máximo crecimiento del animal. Pasada esta edad se raciona la cantidad de alimento para impedir un engrasamiento excesivo. La última semana de este periodo de crecimiento se conoce como periodo de preembuchado y tiene por objetivo aumentar la capacidad del buche del animal mediante su adaptación a la ingesta de grandes cantidades de alimento en poco tiempo. El periodo de preembuchado

puede llevarse a cabo conjuntamente con el periodo de embuchado, lo que acorta la fase de crecimiento en una semana.

II.1.2.3. PERIODO DE EMBUCHADO O CEBO

Comienza cuando las aves cuentan con 12-13 semanas de edad, tiene una duración de unos 13 días (algo más si no se ha hecho la fase de preembuchado) y se lleva a cabo en jaulas individuales o baterías. Su finalidad es suministrar una alimentación forzada e hipercalórica (principalmente a base de maíz entero cocido) a razón de 2 tomas diarias, para conseguir una hipertrofia celular adiposa del hígado (el hígado graso o *foie gras*).

Las condiciones en las que se realiza la cría influyen en el tamaño y características del *foie gras* de los animales (Hermier, 1997; Guy y col., 1998) y también en su composición bioquímica (Leprettre y col., 1998).

Conviene señalar que aunque las fases del ciclo de producción son las mismas para el pato y la oca, los hígados grasos obtenidos presentan algunas diferencias (Castera y col., 1991; Salichon y col., 1994; Blum, 1997):

- El *foie gras* de oca está compuesto por dos lóbulos de similar tamaño con contornos redondeados. Su color es rosado, tiene una textura fina y untuosa y un sabor suave. Por su parte, el *foie gras* de pato tiene una forma triangular con un lóbulo mucho más grande que el otro y un color amarillento. Su sabor y aroma resultan más fuertes y penetrantes, con un apreciable punto de acidez.
- El hígado graso de oca pesa más (700-800 g) que el de pato cruzado (500-600 g).
- El contenido de lípidos del hígado graso de pato (principalmente triglicéridos sintetizados a partir de los hidratos de carbono del maíz) es ligeramente superior al de oca (60% frente al 55%).
- La exudación de grasa del hígado de pato tras el tratamiento térmico es muy superior a la del hígado de oca (41% frente al 14%).
- En ambas especies, los ácidos grasos más abundantes son los monoinsaturados (con una proporción de ácidos grasos insaturados/saturados que varía de 1,7 en la oca a 1,3 en el pato). Destaca el elevado contenido en ácido oleico (C 18:1) y la escasez de ácido linoleico (C18:2) presentes en el hígado.

II.1.3. PRODUCTOS ELABORADOS A PARTIR DEL FOIE GRAS

En España y en otros países de la Unión Europea, el *foie gras* carece de normas de calidad que regulen su producción y comercialización. Por ello, los productores se remiten a la normativa francesa.

Conviene señalar la diferencia existente entre el *foie gras* y el paté de hígado, que se recoge en la norma genérica de calidad para productos cárnicos tratados por calor (Orden de 5 de noviembre, B.O.E. de 9 de noviembre de 1981). Por *foie gras* se entiende exclusivamente el hígado graso, ya sea fresco, en conserva o en semiconserva, procedente de ocas o patos cebados. Sin embargo, la denominación de paté de hígado se aplica a cualquier producto cárnico tratado por calor elaborado con hígado como principal ingrediente y picado más o menos finamente.

Las preparaciones elaboradas a partir de *foie gras* se clasifican en la legislación francesa en función de su composición, según el Decreto 93-999 de 9 de agosto (J.O.R.F. de 14 de agosto de 1993). En este decreto se prohíbe la comercialización de preparaciones de *foie gras* que no se correspondan con las siguientes definiciones (*Tabla 1*):

- **Foie gras entero de oca o pato** (*Figura 5*): Preparación compuesta por uno o varios lóbulos de *foie gras* enteros condimentados. El producto final no debe contener más del 30% de grasa exudada.
- **Foie gras de oca o pato**: Preparación compuesta por trozos de lóbulos de *foie gras* aglomerados y condimentados. La proporción de grasa exudada y homogeneizada no debe superar el 30% del producto final.
- **Bloc de foie gras de oca o pato** (*Figura 6*): Preparación compuesta por trozos de *foie gras* reconstruidos por medios mecánicos y condimentados. Se puede incorporar hasta un 10% de agua en la preparación de la masa, siempre que la tasa de humedad de la porción magra no exceda del 82% en el producto final. Cuando la etiqueta indique la presencia de trozos, la masa total de los trozos debe representar al menos el 30% del producto final.

Tabla 1. Productos elaborados a partir del foie gras			
Denominación	Mezcla de especias	Modo de presentación del hígado	Otros Ingredientes
1. Denominaciones con la expresión "Foie gras"			
Foie gras entero de oca Foie gras entero de pato	No	Uno o varios lóbulos moldeados o un trozo de lóbulo	Trufa (≥3%) Aditivos Condimentos
Foie gras de oca Foie gras de pato	No	Trozos aglomerados de hígado graso	Trufa (≥3%) Aditivos Condimentos
Bloc de foie gras de oca con trozos Bloc de foie gras de pato con trozos	No	Trozos de hígado graso reconstituidos por medios mecánicos. 30% de trozos mínimo	Trufa (≥3%) Aditivos Condimentos
2. Preparaciones con un 75% de Foie gras como mínimo			
Parfait de foie de oca y/o pato	Sí	Hígado graso tratado por medios mecánicos mezclado con hígado de otras aves	Hígado de ave, Grasa de su exudación Trufa (≥3%) Aditivos Condimentos
3. Preparaciones con un 50% de Foie gras como mínimo			
Medallón de paté de hígado de oca y/o pato	Sí	Núcleo central de foie gras (50% mínimo) rodeado por un adorno o picadillo	Picadillo* Trufa (≥1%) Aditivos Condimentos
Galantina de hígado de oca y/o pato	Sí	Mezcla de foie gras y picadillo. (35% mínimo de trozos de hígado graso)	Picadillo Trufa (≥1%) Aditivos Condimentos
Puré o espuma (mousse) de hígado de oca y/o pato	Sí	Mezcla de foie gras y picadillo, todo ello aglomerado	Picadillo Trufa (≥1%) Aditivos Condimentos
4. Preparaciones con un 20% de Foie gras como mínimo			
Toda denominación seguida de las palabras "al foie de oca" o "al foie de pato" con un X% de Foie gras	Sí	Mezcla de foie gras y picadillo aglomerado	Picadillo Trufa (≥1%) Aditivos Condimentos

*ver composición en el texto



Figura 5. Foie gras entero de pato.

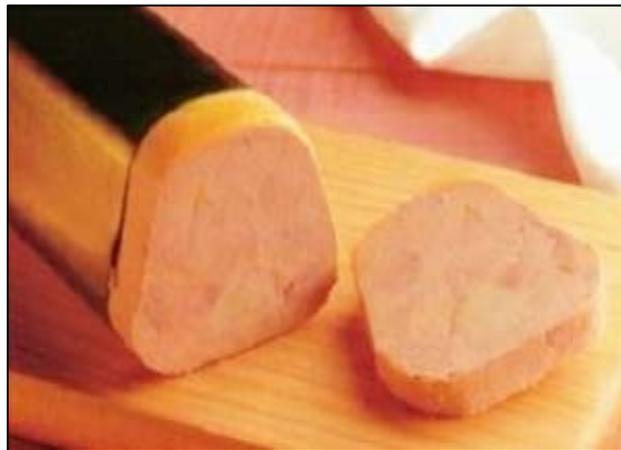


Figura 6. Bloc de foie gras de pato con trozos.

- **Parfait de foie de oca y/o pato:** Preparación compuesta por un mínimo de 75% de *foie gras* de pato, oca o sus mezclas tratado por medios mecánicos, a los que se pueden añadir hígado magro de estas especies y condimentos. En la preparación de la masa se puede incorporar grasa de exudación procedente del *foie gras* y hasta un 10% de agua añadida. La tasa de humedad de la fracción magra no puede superar el 82% en el producto final.
- **Medallón de paté de hígado de oca y/o pato:** Preparación compuesta por un mínimo del 50% de *foie gras* o de bloc de *foie gras* en un núcleo central, junto con un picadillo, que es un producto elaborado a partir de uno o varios de los siguientes ingredientes: magro o grasa de cerdo, de ternera o de ave, hígado de cerdo, hígado de ave, grasa de exudación, huevos, leche, lactoproteínas, harina y almidón. La tasa de humedad del producto final no debe superar el 80%.
- **Galantina de hígado de oca y/o pato:** Preparación compuesta por un mínimo del 50% de *foie gras* o de bloc de *foie gras* mezclado con un picadillo. La porción de *foie gras* de la galantina, reconstituido o no, visible al corte, debe representar al menos un 35% de la masa del producto final, sin contar la grasa ni la gelatina de cobertura. La tasa de humedad de la fracción desengrasada y sin almidón debe ser inferior al 80%.
- **Mousse de hígado de oca y/o pato:** Preparación compuesta por un mínimo del 50% de *foie gras* mezclado con un picadillo y tratado para darle al producto la textura característica de su denominación.
- **Productos de charcutería “al foie de oca” o “al foie de pato”:** Cualquier producto cárnico que incluya en su composición al menos un 20% de *foie gras*. La denominación de venta del producto se completa con los términos “al foie de oca” o “al foie de pato”.

Además de los ingredientes propios de cada producto, todas las denominaciones de *foie gras* citadas pueden estar condimentadas con: sal, azúcar, especias, plantas aromáticas, aguardiente, licores y vino. El aporte total de estos condimentos no puede superar el 4% de la masa preparada, estando limitado el contenido de sacarosa a 2 gramos por kilo de preparación. También está permitida la práctica de cubrir con gelatina las distintas preparaciones de *foie gras*.

Cualquiera de las denominaciones de *foie gras* reconocidas por la legislación francesa puede contener trufas negras (*Tuber melanosporum*), en cuyo caso recibe el calificativo de “trufado”. El *foie gras* entero, *foie gras*, bloc de *foie gras* y parfait trufados, deben contener al menos un 3% de trufas. Sin embargo, en las restantes denominaciones el contenido en trufas puede variar entre el 1% y el 3%, siendo necesario indicar dicho porcentaje en la etiqueta del producto.

Por lo que se refiere a la incorporación de aditivos, la legislación francesa sólo permite nitritos, ácido ascórbico y ascorbato de sodio para cualquiera de las denominaciones.

La legislación francesa clasifica los productos a base de *foie gras* en función de su composición. Sin embargo, otro criterio de clasificación frecuentemente empleado es el que se refiere al tratamiento térmico que recibe el producto. En función de este criterio los productos se clasifican en:

- **Foie gras “cuit” (cocido):** Se elabora a partir de hígados grasos (*foie gras*) seleccionados, a los que se les quitan venas y nervios, y que son sometidos a un tratamiento térmico de esterilización a 108/110°C. Es una conserva que no requiere refrigeración.
- **Foie gras “micuit” (semicocido):** Es un producto pasteurizado a 70°C durante 30 minutos, por lo que se considera una semiconserva y debe mantenerse en refrigeración. Puede aplicarse este tratamiento al hígado entero o en medallones. La temperatura a la que se realiza la pasteurización influye en la calidad organoléptica del *foie gras* (Le Ba y Zuber, 1996).
- **Foie gras escaldado al vacío:** Es una semiconserva de presentación reciente. Se presenta envasado al vacío en una película de plástico retráctil. El *foie gras* que recibe este tratamiento de cocción al vacío a baja temperatura tiene una vida útil de cuatro semanas.

En los últimos años se están introduciendo nuevas tecnologías en el procesado de *foie gras*, como el tratamiento mediante altas presiones hidrostáticas (El Moueffak y col., 1995) para la elaboración de semiconservas.

En España y en la Unión Europea, además de la normativa francesa, no existe ningún otro reglamento, decisión o norma que regule la comercialización de los productos derivados del *foie gras*.

El Reglamento 1538/1991/CE (D.O.C.E. de 5 de junio de 1991) que establece las disposiciones de aplicación del Reglamento 1906/1990/CE por el que se fijan normas de comercialización aplicables a las aves de corral, determina el peso neto mínimo que tienen que tener los hígados de pato (300 g) y de oca (400 g) que se emplean en la producción de *foie gras*. Posteriormente, el Reglamento 1321/2002/CE (D.O.C.E. de 22 de julio de 2002) modifica el Reglamento 1538/1991/CE, e incorpora el siguiente párrafo «Cuando en la etiqueta de carne procedente de patos y ocas criados para la producción de “*foie gras*” se indique que se trata de cría al aire libre, deberá también figurar la mención “procedente de la producción de *foie gras*”».

II.1.4. COMERCIALIZACIÓN

La producción de *foie gras* en Francia se está incrementando de forma notable debido a la mejora en las técnicas de producción, a la selección genética de las especies productoras (Rousselot-Pailley, 1997) y al aumento creciente de la demanda procedente de otros países, entre los que cabe citar a Suiza, España, Bélgica, Alemania y Japón. En el suroeste de Francia se produce el 80% del *foie gras* francés, aunque otras regiones de la vertiente atlántica, también están aumentando su producción. Según datos del Departamento de Aduanas francés, del Comité Interprofesional Francés de Palmípedas Grasas (CIFOG) y del OFIVAL (*Office National Interprofessionnel des Viandes, de l'Élevage et de l'Aviculture*), la producción de *foie gras* fue de 15.000 Tm en 1999, un 14% superior a la de 1998. Las exportaciones francesas de *foie gras* ascendieron en 1999 a 2.155 Tm, lo que supuso un incremento del 38,7% respecto del año anterior. En el año 2001, las exportaciones se situaron ya en 2.532,9 Tm, un 10% superior, desglosándose de la siguiente manera: 1.045,7 Tm de *foie gras* fresco (*Tabla 2*), 279,5 Tm de *foie gras* congelado (*Tabla 3*) y 1.207,7 Tm de *foie gras* en conserva. Finalmente, las exportaciones de *foie gras* francés ascendieron a 2.838 Tm en 2002, distribuyéndose: 1.144 Tm de *foie gras* fresco (*Tabla 2*), 331,9 Tm de *foie gras* congelado (*Tabla 3*) y 1.362,1 Tm de *foie gras* en conserva.

Tabla 2. Comercio exterior francés de foie gras fresco				
	Peso (kilos)	Porcentaje	Peso (kilos)	Porcentaje
	2001	% 2001/2000	2002	% 2002/2001
Comercio exterior de foie gras fresco de oca				
EXPORTACIONES				
Unión Europea:	82.700	26,1	85.100	2,9
Alemania	46.900	40,0	43.300	-7,7
Bélgica/Luxemburgo	8.900	20,3	13.200	48,3
Países Bajos	8.900	-30,2	6.800	-22,7
Reino Unido	8.900	36,8	7.800	200,0
Otros países:	28.800	102,8	71.400	147,9
Japón	13.300	375,0	50.100	276,7
Hong Kong	5.500	1,9	14.800	169,1
Total	111.500	39,7	156.500	40,4
IMPORTACIONES				
Unión Europea	23.600	---	17.400	---
Otros países:	618.700	-33,1	599.200	-3,2
Hungría	590.400	-30,0	533.300	-9,7
Bulgaria	1.900	-54,8	5.900	210,5
Israel	26.300	-65,6	60.000	128,1
Total	642.300	-32,4	616.600	-4,0
Comercio exterior de foie gras fresco de pato				
EXPORTACIONES				
Unión Europea:	696.100	9,0	720.900	3,6
Bélgica	124.400	14,9	159.200	28,0
Reino Unido	96.500	-17,2	97.900	1,5
Países Bajos	27.800	-26,1	19.300	-30,6
España	381.000	21,3	371.100	-2,6
Otros países:	238.100	13,0	266.600	12,0
Suiza	143.900	2,5	144.600	0,5
Japón	65.100	68,7	70.400	8,1
Total	934.200	10,0	987.500	5,7
IMPORTACIONES				
Unión Europea	21.100	123,4	24.600	17,1
Bélgica	15.300	466,7	6.700	-56,2
Reino Unido	2.800	-56,3	0	-100,0
Otros países	822.300	-3,6	567.300	-31,0
Hungría	452.000	1,9	293.500	-35,1
Bulgaria	367.000	-9,9	267.100	-27,3
Total	843.300	-2,2	591.900	-29,8

Fuente: Office National Interprofessionnel des Viandes, de l'Élevage et de l'Aviculture (años 2001-2002).

Tabla 3. Comercio exterior francés de foie gras congelado				
	Peso (kilos)	Porcentaje	Peso (kilos)	Porcentaje
	2001	% 2001/2000	2002	% 2002/2001
Comercio exterior de foie gras congelado de oca				
EXPORTACIONES				
<i>Unión Europea</i>	1.800	-66,7	5.400	200,0
<i>Otros países</i>	21.700	181,8	37.000	70,5
Total	23.500	79,4	42.400	80,4
IMPORTACIONES				
<i>Unión Europea</i>	1.400	7,7	8.200	485,7
<i>Otros países</i>	230.000	33,3	295.800	28,6
<i>Hungría</i>	200.200	56,0	290.500	45,1
<i>Bulgaria</i>	21.700	-44,2	0	-100,0
Total	231.400	33,1	304.000	31,4
Comercio exterior de foie gras congelado de pato				
EXPORTACIONES				
<i>Unión Europea</i>	81.400	55,0	102.100	25,4
<i>Otros países</i>	174.600	51,7	187.400	7,3
Total	256.000	52,7	289.500	13,1
IMPORTACIONES				
<i>Unión Europea</i>	31.100	-50,6	4.000	-87,1
<i>Otros países</i>	669.000	36,8	756.400	13,1
<i>Hungría</i>	179.200	248,0	314.400	75,4
<i>Bulgaria</i>	489.400	12,4	403.700	-17,5
Total	700.100	26,9	760.400	8,6

Fuente: Office National Interprofessionnel des Viandes, de l'Élevage et de l'Aviculture (años 2000-2002).

Los países europeos, encabezados por Suiza y seguidos de cerca por España, Bélgica y Luxemburgo, son los principales destinatarios del *foie gras* francés. Las exportaciones a terceros países sólo suponen un tercio del total. No obstante, Francia importa cada año unas 2.000 Tm de *foie gras* (2.464,7 en 2001 y 2.303,4 en 2002), principalmente de Hungría, aunque también de Bulgaria, Polonia e Israel. Conviene señalar que el *foie gras* de pato supone más del 90% de la producción y que en los últimos años se acentúa la tendencia hacia al predominio de este *foie gras*, de sabor más pronunciado que el de oca.

Por lo que se refiere al mercado español, las exportaciones españolas de hígados grasos frescos de pato y oca despegaron en 1999 con 18.214 kilos de hígados grasos, lo que supuso un gran aumento con relación a las exportaciones del año anterior, registrándose una disminución paulatina desde entonces (*Tabla 4*).

La mayoría de las exportaciones tienen por destino Bélgica (72%) y sólo comprenden hígados grasos de pato, ya que España no exportó hígados grasos de oca hasta el año 2001 (*Tabla 5*).

Las importaciones de hígados grasos, con un valor económico cercano a los 3.000 euros en el año 1999, proceden principalmente de Francia (99,9% en 1997, 82,6% en 1999 y 95,8 en 2001) y son en su mayoría de pato (94% de pato frente a 6% de oca en 1999, 94,6% de pato frente a 5,4% de oca en 2001).

De forma similar a lo que se observa en el mercado francés, desde el año 1997 el porcentaje de hígados grasos de pato consumidos en relación con el total ha aumentado, lo que significa que el consumo de oca ha disminuido.

La *Tabla 5* refleja el descenso progresivo de las importaciones de hígados grasos de oca procedentes de Francia desde 1997 (92,7% en 1997, 23,1% en 1999 y 20,3% en 2001), al tiempo que han aumentado las importaciones procedentes de Bélgica.

En lo referente a preparados cárnicos elaborados a base de hígado graso de oca y pato, las exportaciones españolas fueron de 35.800 kilos en 1999 y de 22.000 kilos en 2001, representando sólo el 3,7% del total de exportaciones de preparados de carne que contienen hígado de cualquier especie en el año 1999.

Tabla 4. Comercio exterior español de hígados grasos frescos de pato

	Peso (kilos)					Valor (miles euros)				
	1997	1998	1999	2000	2001	1997	1998	1999	2000	2001
EXPORTACIONES										
Bélgica	---	---	13.107	15.937	1.642	---	---	260	302,8	22,2
Francia	10	608	5.030	---	9.837	0,31	11	11	---	157,5
Uruguay	---	---	60	---	---	---	---	3	---	---
Portugal	---	16	17	6	158	---	0,51	0,5	0,2	4,4
Reino U.	---	---	---	---	2	---	---	---	---	0,007
Alemania	---	---	---	---	155	---	---	---	---	5,1
Dinamarca	---	---	---	---	50	---	---	---	---	1,6
Total	10	624	18.214	15.943	11.844	0,31	11,51	274,5	303	190,8
IMPORTACIONES										
Francia	102.129	205.513	167.381	193.847	323.086	1.428	1.942	2.695	3.298	4.213
Reino U.	---	---	12.015	920	---	---	---	51	3,2	---
Hungría	---	---	7.587	4.403	---	---	---	98	55	---
Portugal	---	---	8.175	2.689	---	---	---	3	7,3	---
Bélgica	---	720	6.938	4.098	13.968	---	8	87	56,3	213,8
Bulgaria	---	---	500	---	---	---	---	7	---	---
Alemania	30	---	---	---	8	0,14	---	---	---	0,1
P. Bajos	---	---	---	---	90	---	---	---	---	1,7
Dinamarca	---	---	---	---	130	---	---	---	---	2,9
Total	102.155	206.233	202.596	205.957	337.282	1.428,14	1.950	2.941	3.419,8	4.431,5

Fuente: Departamento de Aduanas e Impuestos Especiales. Ministerio de Hacienda (años 1997-2001).

Tabla 5. Comercio exterior español de hígados grasos frescos de oca

	Peso (kilos)					Valor (miles euros)				
	1997	1998	1999	2000	2001	1997	1998	1999	2000	2001
EXPORTACIONES										
<i>Bélgica</i>	---	---	---	---	1.170	---	---	---	---	19,3
<i>Francia</i>	---	---	---	---	3	---	---	---	---	0,073
Total	---	---	---	---	1.173	---	---	---	---	19,373
IMPORTACIONES										
<i>Bélgica</i>	1.311	5.130	8.740	17.658	14.152	27	99	143	305	235,8
<i>Francia</i>	16.757	12.867	2.978	1.659	3.852	276	245	55	28,6	74,8
<i>Hungría</i>	---	---	1.178	1.701	---	---	---	21	40	---
<i>Alemania</i>	---	---	---	144	982	---	---	---	8	49,4
Total	18.068	17.997	12.896	21.162	18.986	303	344	219	381,6	360

Fuente: Departamento de Aduanas e Impuestos Especiales. Ministerio de Hacienda (años 1997-2001).

Dentro de este tipo de productos, las importaciones de preparados de carne que contienen el 75% o más de hígados grasos de pato y/o oca (*Tabla 6*), supusieron un peso total de 134.000 kilos en 1999 y de 80.000 kilos en 2001, con un valor económico de 1.500 euros y en su mayoría proceden de Francia (más del 97%). Las exportaciones españolas de estos productos son todavía escasas, pero cada vez es mayor el número de países a los que exportamos.

Finalmente conviene reseñar que el aumento de la demanda de *foie gras* debe ir acompañado de un incremento en las exigencias en materia de higiene alimentaria, desde la producción primaria a la comercialización final del producto. El empleo de métodos de producción animal apropiados, así como la implantación de sistemas APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico) conjuntamente con unas buenas prácticas higiénicas de fabricación deben asegurar la calidad final de los productos comercializados (Bonneau, 1995).

Actualmente, al tiempo que se incrementa el número de consumidores de *foie gras* (Pé, 1997), están apareciendo una gran cantidad de productos diferentes en el mercado, lo que está favoreciendo el aumento de prácticas fraudulentas para modificar la textura del producto o disminuir su coste de fabricación, mediante la adición de carnes de especies animales más baratas.

La aparición de productos como las pastas o paté de hígado, fabricados a base de hígado y carne picada procedente de pato, oca, cerdo o vaca¹, mezclados con grasas de aves y cerdo, hace necesario disponer de técnicas analíticas rápidas que permitan comprobar la identidad de las materias primas con las que han sido elaborados.

¹ Los nombres científicos de las especies animales que aparecen en el texto se recogen en el glosario de nombres científicos.

Tabla 6. Comercio exterior español de preparados cárnicos que contengan en peso el 75% o más de hígados grasos de oca y pato

	Peso (kilos)					Valor (miles euros)				
	1997	1998	1999	2000	2001	1997	1998	1999	2000	2001
EXPORTACIONES										
<i>Francia</i>	0	---	6.998	---	1.957	8,9	---	21,2	---	47,2
<i>Argentina</i>	---	---	24	---	---	---	---	0,97	---	---
<i>Nueva Zelanda</i>	---	---	122	---	---	---	---	5,17	---	---
<i>Italia</i>	---	0	0	---	26	---	0,57	0,04	---	1,2
<i>Bélgica</i>	113	---	---	---	---	0,5	---	---	---	---
<i>Andorra</i>	261	---	---	150	432	1,1	---	---	1,7	3,7
<i>Austria</i>	---	0	---	---	9	---	0,29	---	---	0,3
<i>Guatemala</i>	6	---	---	---	---	0,1	---	---	---	---
<i>Japón</i>	20	---	---	---	---	0,45	---	---	---	---
<i>Países Bajos</i>	---	0	---	---	---	---	0,14	---	---	---
<i>Reino Unido</i>	0	---	---	---	20	0,3	---	---	---	2,26
<i>Taiwan</i>	39	---	---	---	---	0,76	---	---	---	---
<i>Dinamarca</i>	---	---	---	---	178	---	---	---	---	6
<i>Finlandia</i>	---	---	---	---	20	---	---	---	---	0,25
<i>Líbano</i>	---	---	---	---	105	---	---	---	---	2
<i>México</i>	---	---	---	---	400	---	---	---	---	7,5
<i>Portugal</i>	---	---	---	---	17	---	---	---	---	0,56
<i>Rusia</i>	---	---	---	---	95	---	---	---	---	23
Total	439	0	7.144	150	3.259	12,11	1	27,38	1,7	93,97
IMPORTACIONES										
<i>Francia</i>	101.830	83.386	130.930	75.459	80.409	1.305	1.365,9	1.465,5	1.320,7	1.564,4
<i>Dinamarca</i>	696	951	1.389	948	---	2,9	10,4	12,8	7,76	---
<i>Italia</i>	40	---	820	---	82	0,8	---	1,85	---	9,9
<i>Alemania</i>	2.276	1.104	672	676	159	18,9	14,1	12,5	8,3	5,1
<i>Bélgica</i>	0	620	168	23	---	6,6	7,6	0,55	1,4	---
<i>Grecia</i>	329	---	---	---	---	4,5	---	---	---	---
Total	105.171	86.061	133.979	77.106	80.650	1.338,7	1.398	1.493,2	1.338,1	1.579,4

Fuente: Departamento de Aduanas e Impuestos Especiales. Ministerio de Hacienda (años 1997-2001).

II.2. TÉCNICAS BASADAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Las técnicas utilizadas en la identificación de especies animales cuando no se dispone de base anatómica se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellas basadas en el **análisis de proteínas** y las que se centran en el **análisis del ADN** o técnicas genéticas. Si bien los métodos basados en el análisis de proteínas han sido los más utilizados, los grandes avances que han tenido lugar en los últimos años en las técnicas de biología molecular han permitido el rápido desarrollo de numerosas técnicas genéticas que se han aplicado con éxito a la identificación de especies.

Los métodos que se utilizan para la identificación de especies animales, basados en el análisis de proteínas, incluyen distintas técnicas electroforéticas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) y las técnicas inmunológicas.

Las proteínas del tejido muscular son, en esencia, muy similares en todas las especies animales pudiéndose clasificar, atendiendo a su solubilidad, en tres grandes grupos:

- Las **proteínas sarcoplásmicas**, que constituyen un 30-35% de las proteínas totales, se extraen fácilmente con agua o soluciones salinas diluidas. A este grupo pertenecen gran número de enzimas implicadas en el metabolismo intermediario de la célula. Esto hace que las proteínas sarcoplásmicas puedan resultar muy adecuadas para la identificación de especies y por lo tanto, que sean las más utilizadas.
- Las **proteínas miofibrilares**, que constituyen el 65-75% de las proteínas totales, se extraen empleando soluciones salinas de fuerza iónica media o alta. De ellas, la miosina, actina, tropomiosina y troponina son las proteínas mayoritarias. Aunque sus secuencias de aminoácidos son muy conservadas entre especies, pueden ser importantes en la identificación de las mismas cuando el producto ha sido sometido a una desnaturalización por calor.
- Las **proteínas del tejido conectivo o del estroma**, representan de un 3-10% del contenido proteico total en la carne. Son insolubles en soluciones salinas y es necesario el empleo de soluciones ácidas o básicas para su completa

disolución. Dentro de ellas se encuentran la elastina y el colágeno, siendo esta última la más abundante. Al igual que sucede con las proteínas miofibrilares, resultan de interés en la identificación de especies animales cuando se trata de productos desnaturalizados por calor.

En comparación con las técnicas genéticas, las técnicas basadas en el análisis de proteínas presentan las siguientes ventajas: (a) las muestras se pueden analizar rápidamente; (b) el coste de los reactivos es relativamente bajo; (c) las proteínas tienen una función conocida; y (d) las técnicas son muy sencillas de aprender (Ferguson y col., 1995).

Asimismo, estas técnicas presentan también inconvenientes importantes: (a) las muestras deben ser frescas o congeladas y encontrarse en buen estado; (b) se requieren grandes cantidades de muestra; (c) existe un bajo número de alelos por *locus*; y (d) el análisis de perfiles puede resultar difícil, especialmente en individuos poliploides (Ferguson y col., 1995).

Los métodos basados en el análisis de proteínas que se utilizan para la identificación de especies animales incluyen distintas técnicas electroforéticas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), así como las técnicas inmunológicas.

II.2.1. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

La electroforesis es un procedimiento analítico basado en la separación de moléculas cargadas en un medio acuoso, bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado entre dos electrodos, uno positivo y otro negativo. El movimiento de las moléculas, en nuestro caso proteínas, dependerá de su tamaño y de la carga neta que presenten en el pH del tampón seleccionado para el análisis. Aquellas moléculas que tengan una carga neta mayor, tenderán a moverse más rápidamente que aquellas con menor carga neta. En el caso de que esta sea igual, las moléculas menores se desplazarán con mayor rapidez.

La identificación de especies se realiza comparando el perfil electroforético obtenido a partir de las proteínas musculares de las muestras problema, con los patrones de bandas de muestras de referencia. La comparación puede ser visual, o bien utilizando un densitómetro o un analizador de imágenes. Habitualmente, para

comparar los patrones de bandas es necesario analizar las muestras de referencia en el mismo gel que las desconocidas, ya que pequeños cambios en las condiciones experimentales pueden alterar los perfiles proteicos obtenidos (AOAC, 1990). Sin embargo, en la identificación de especies mediante la técnica electroforética de isoelectroenfoque, se pueden utilizar fotografías o geles de muestras de referencia obtenidos anteriormente (AOAC, 1990), ya que se trata de una técnica cuyos resultados son reproducibles.

Las técnicas electroforéticas incluyen varios sistemas de separación. La elección de uno u otro va a depender del grado de resolución que se desee obtener, así como del tipo de muestra que se quiera analizar: fresca o congelada, sometida a un tratamiento térmico ligero o a un proceso de esterilización.

En general, las técnicas electroforéticas en gel han sido poco utilizadas debido a su bajo poder de resolución. Sin embargo, el isoelectroenfoque (IEF), la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y la electroforesis capilar (EC) son los sistemas electroforéticos más utilizados en la identificación de especies de animales de abasto.

II.2.1.1. ISOELECTROENFOQUE (IEF)

El isoelectroenfoque es una técnica de electroforesis en un gradiente de pH que permite separar componentes que solamente difieren en 0,001 unidades de pH. Cuando se aplica un campo eléctrico, las proteínas migran hacia los diferentes electrodos según su carga eléctrica. La proteína entra en zonas de pH más bajas y más altas de acuerdo con la relación carga neta/curva de pH, por lo que gradualmente va perdiendo su carga neta. Cuando la proteína alcanza su punto isoeléctrico (carga neta cero), cesa su migración y precipita. Por tanto, en la técnica del isoelectroenfoque la separación depende del punto isoeléctrico de la proteína y no de su carga y tamaño.

La técnica de isoelectroenfoque se puede llevar a cabo tanto en geles de poliacrilamida, como en geles de agarosa tratada químicamente (*agarosa IEF*). La agarosa no presenta los inconvenientes de neurotoxicidad, dificultades en la polimerización y largos periodos de destañido que tiene la acrilamida (An y col., 1989). Sin embargo, la resolución que se obtiene con los geles de agarosa es

menor, aunque en ocasiones suficiente para identificar incluso especies próximas filogenéticamente (Santín y Centrich, 1997). Por otro lado, los inconvenientes de polimerización de la poliacrilamida se pueden solventar mediante el empleo de geles comerciales.

El isoelectroenfoco es una técnica electroforética que se ha utilizado en la identificación de numerosas especies de animales de abasto. Su gran poder de resolución ha hecho posible su aplicación tanto en productos frescos, como en aquellos sometidos a distintos tratamientos tecnológicos.

Slattery y Sinclair (1983) emplearon con éxito esta técnica para diferenciar carnes frescas procedentes de distintas especies animales como la vaca, búfalo y canguro. Sin embargo, no pudieron diferenciar carnes procedentes de especies estrechamente relacionadas como la oveja y la cabra, o el caballo y el burro.

Bauer y Hofmann (1989) identificaron diferentes especies animales (vaca, cerdo, oveja, caballo, ciervo, conejo, pollo y pavo) mediante isoelectroenfoco, en productos cárnicos y en carnes tratadas térmicamente.

Santín y Centrich (1997) identificaron mediante isoelectroenfoco en gel de poliacrilamida la presencia de carne de vaca, cerdo, pollo, pavo, caballo y oveja en una gran variedad de preparados y productos cárnicos (carnes picadas, hamburguesas, embutidos crudos curados, salchichas, etc.).

Skarpeid y col., (1998) identificaron la composición de diferentes mezclas cárnicas frescas de vaca, cerdo y pavo mediante isoelectroenfoco de la fracción sarcoplásmica de las proteínas musculares.

Renon y col., (2003) identificaron muestras de ciervo, corzo y rebeco mediante isoelectroenfoco de los ácidos grasos no volátiles.

En comparación con otras técnicas electroforéticas, el IEF presenta numerosas ventajas: (a) durante la electroforesis, las proteínas se localizan en zonas estrechas, lo que mejora la resolución y la sensibilidad; (b) la técnica se puede modificar en muchos aspectos ajustándose a los requerimientos analíticos que se necesiten; (c) al final de la electroforesis el sistema está en equilibrio y por tanto, variaciones en los parámetros experimentales influyen menos en el patrón proteico obtenido, lo que permite utilizar fotografías para comparar los patrones de bandas

de las muestras problema con muestras de referencia; y (d) la utilización de geles preparados comercialmente, en el caso de los de poliacrilamida, acoplados a aparatos semiautomatizados como el Phastsystem™, permite incluso una mayor reproducibilidad en los resultados, así como una disminución en el tiempo requerido para cada análisis.

La técnica de IEF, sin embargo, presenta también inconvenientes importantes: (a) los perfiles proteicos obtenidos tienen un gran número de bandas y su interpretación resulta, en algunos casos, complicada; (b) se trata de una técnica laboriosa que requiere operarios especializados e instrumental adecuado; y (c) es una técnica cara, lo cual dificulta su implantación en laboratorios de análisis de alimentos.

II.2.1.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE)

Esta técnica consiste en disolver las proteínas de la muestra en soluciones del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS). De este modo, las proteínas pierden sus cargas individuales adquiriendo una carga neta negativa como resultado del complejo *proteína-anión SDS* formado (Weber y Osborn, 1969). La cantidad de detergente que se incorpora por unidad de masa es la misma para todas las proteínas, y en consecuencia, la movilidad en la electroforesis va a depender exclusivamente de la masa. La separación de las proteínas, una vez disueltas, se hace en geles de poliacrilamida a los que se incorpora también SDS.

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS se ha empleado muy poco en muestras no sometidas a tratamiento térmico. Como se expuso en el apartado anterior, el IEF ha sido la técnica de elección en este tipo de productos gracias a su mayor poder de resolución.

Bonnefoi y col., (1986) diferenciaron *foie gras* de pato y oca mediante una técnica electroforética en gel de poliacrilamida utilizando Triton X-100 y urea. Con esta técnica obtuvieron un pico específico en el densitograma en las muestras de pato, cuya movilidad electroforética era mayor que la del pico específico correspondiente a la oca. En muestras que incluían ambas especies apreciaron dos picos diferenciados. La técnica permitía detectar la incorporación de una especie en otra hasta niveles del 10%.

Hofmann (1987) trató de diferenciar especies animales como la vaca, cerdo y caballo mediante SDS-PAGE, pero obtuvo patrones proteicos muy similares en las tres especies consideradas, observando sólo diferencias en la intensidad de las bandas.

Zerifi y col., (1991) detectaron la presencia de carne de caballo en mezclas con vaca mediante SDS-PAGE con un límite de detección del 10%.

Savage y col., (1995) utilizaron la técnica de SDS-PAGE para analizar muestras frescas y enlatadas procedentes de carnes recuperadas mecánicamente y de carnes deshuesadas de vaca, cordero, cerdo, pollo y pavo. Los perfiles proteicos obtenidos fueron diferentes en las muestras frescas y enlatadas como consecuencia de la degradación proteica.

La técnica de SDS-PAGE se ha utilizado también para la identificación de especies en muestras sometidas a tratamiento térmico, ya que el detergente SDS permite la extracción de las proteínas desnaturalizadas. Esta técnica resulta, además, más sencilla que el IEF en geles con urea (Scobbie y Mackie, 1988).

Ozgen Arun y Ugur (2000) identificaron varias especies animales (vaca, cerdo y caballo) en salchichas calentadas a 75°C durante 15 min mediante SDS-PAGE. El límite de detección de caballo y cerdo en vaca fue del 5%.

En cuanto a los inconvenientes de la técnica de SDS-PAGE, se puede decir que son los mismos que se han mencionado en el apartado anterior para el IEF. Es decir, la complejidad en los perfiles proteicos obtenidos y la necesidad de operarios e instrumental especializado.

II.2.1.3. ELECTROFORESIS CAPILAR (EC)

La electroforesis capilar es una técnica electroforética que también se ha aplicado a la diferenciación de especies. Aunque sus bases se establecieron en 1937, su uso no se generalizó hasta la comercialización reciente de equipos instrumentales adecuados (Wätzig y Dette, 1994; Cancalon, 1995a, 1995b). Esta técnica se basa en separar moléculas con idéntico cociente carga/masa y diferentes masas sometiéndolas a un campo eléctrico en el interior de un tubo de silica que tiene de 50 a 150 μm de diámetro. La ventaja que presenta este método con respecto a las otras técnicas de análisis es que permite detectar y cuantificar simultáneamente

diferentes moléculas ya que el equipo está dotado de un sistema que elimina el tampón de relleno de la columna y lo reemplaza por otro de forma automática, permitiendo analizar los diferentes componentes de una muestra sin necesidad de intervenir. Otras ventajas de este método son la rapidez del análisis, que puede efectuarse en menos de 10 minutos aunque se ha establecido un tiempo medio de 20 minutos (sólo se requieren intervalos de 3 minutos para el lavado y reequilibrado de la columna entre dos análisis consecutivos) y el pequeño volumen requerido. A pesar de que inicialmente a esta técnica se le atribuía falta de sensibilidad, este problema se está subsanando en la actualidad mediante la introducción de mejoras en los sistemas de detección. Su principal limitación reside, sin embargo, en la puesta a punto de sistemas de detección adecuados para cada compuesto que además, han de ser muy sensibles debido a los pequeños volúmenes que se utilizan. En el caso de las proteínas, se utilizan normalmente sistemas de detección de ultravioleta (UV) (Cancalon, 1995b).

Existen distintos tipos de EC, pero la más común es la electroforesis capilar de zona (ECZ), que utiliza reactivos de amplio intervalo de pH (desde ácidos hasta bases) para separar los distintos componentes en una muestra (Barnes, 1995). El análisis mediante ECZ de la fracción sarcoplásmica de las proteínas del músculo, ha permitido la identificación de distintas especies de animales de abasto, tanto frescas como congeladas.

Cota Rivas y Vallejo-Córdoba (1997, 1998) diferenciaron especies como la vaca, cerdo y pavo utilizando esta técnica. Los perfiles de las proteínas sarcoplásmicas obtenidos para cada una de las especies estudiadas, resultaron ser especie-específicos.

La electroforesis capilar permite un análisis completamente automatizado de proteínas. Esto supone una importante ventaja frente a los actuales métodos electroforéticos, que son laboriosos y requieren operarios especializados.

II.2.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) es un procedimiento analítico basado en la separación de

moléculas en función de su diferente polaridad. La técnica de HPLC en fase reversa (RP-HPLC), que es la que más se ha utilizado en la identificación de especies animales, permite separar las proteínas atendiendo a su distribución entre una fase móvil polar y una fase orgánica que está fija a una matriz (Ashoor y col., 1988). De este modo se obtienen perfiles cromatográficos de proteínas característicos de cada especie, que permiten su identificación mediante comparación con cromatogramas de referencia.

El RP-HPLC presenta ventajas importantes frente a las técnicas electroforéticas: es rápido, sencillo, tiene gran poder de resolución, no se utilizan reactivos tóxicos y una vez obtenidos los cromatogramas, no es necesario el análisis conjunto de muestras de referencia gracias a la gran reproducibilidad de los resultados (McCormick y col., 1988). Por otro lado, el uso de esta técnica es especialmente interesante desde el punto de vista de la cuantificación, ya que los sistemas de detección se podrían emplear para estimar la cantidad de proteína perteneciente a una especie presente en una mezcla (Toorop y col., 1997a).

Los cromatogramas de las proteínas sarcoplásmicas obtenidos mediante RP-HPLC, han permitido la identificación de un buen número de especies animales tanto frescas como congeladas. Ashoor y col., (1988) utilizaron esta técnica para identificar 6 especies de interés comercial, entre las que se encontraban el cerdo, pollo, pavo, pato, vaca y cordero.

Espinoza y col., (1996) identificaron y cuantificaron alrededor de 50 especies animales diferentes analizando mediante RP-HPLC su hemoglobina sanguínea.

Toorop y col., (1997a) identificaron muestras frescas de vaca, cordero, cerdo y pavo mediante HPLC empleando proteínas miofibrilares. En otro trabajo, Toorop y col., (1997b) aplicaron la técnica de HPLC para detectar el porcentaje de incorporación de cerdo en vaca en muestras frescas, congeladas y cocinadas. Aunque los perfiles cromatográficos difirieron entre las muestras frescas y cocinadas, los patrones obtenidos fueron reproducibles y permitieron la identificación de las distintas especies.

II.2.3. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Las técnicas inmunológicas son procedimientos analíticos basados en la reacción específica entre un *antígeno* (que es la sustancia que queremos analizar) y su correspondiente *anticuerpo*. Estas técnicas, cuyo desarrollo se inició en el campo clínico, se han empleado en el análisis de los alimentos desde 1980 aproximadamente. En lo que se refiere a la identificación de especies, las técnicas inmunológicas han sido ampliamente utilizadas en el análisis de productos cárnicos (Martín y col., 1988a, 1988b, 1988c; Smith, 1995; Hsieh y col., 1998; Macedo-Silva y col., 2000; Chen y col., 2002).

La aplicación de las técnicas inmunológicas a la identificación de especies presenta importantes ventajas con respecto al empleo de técnicas electroforéticas y de HPLC: disminución de la cantidad de muestra necesaria, reducción del tiempo y coste del análisis, utilización de instrumental poco complejo, y la posibilidad de semi-automatización y de aplicación en pruebas de campo y *kits* miniaturizados.

Los ensayos inmunológicos empleados en la identificación de especies de animales de abasto incluyen técnicas de inmunodifusión en geles de agar, inmunoelectroforesis y diversas técnicas inmunoenzimáticas.

II.2.3.1. INMUNODIFUSIÓN EN GELES DE AGAR

En esta técnica, antígeno y antisuero se depositan en unos pocillos cortados en un gel de agar. Ambos reactivos difunden a través del gel y en caso de correspondencia, forman en su recorrido complejos *antígeno-anticuerpo* que se visualizan como líneas blancas y opacas de precipitado (*Figura 7*).

Cordal de Bobbi y col., (1985) utilizaron la inmunodifusión en geles de agar para identificar especies como la vaca, oveja, cerdo, caballo y conejo en carnes frescas.

Kangethe y col., (1982) consiguieron con esta técnica identificar 14 especies de la familia de los bóvidos en carnes y productos cárnicos frescos, cocinados y enlatados utilizando un inmunosuero frente a antígenos musculares termoestables.

Cutufelli y col., (1993) desarrollaron una prueba de campo (MULTI-SIFT) basada en la inmunodifusión en geles de agar, que les permitió detectar vaca, oveja, cerdo, caballo, pollo y ciervo en distintos productos cárnicos frescos.

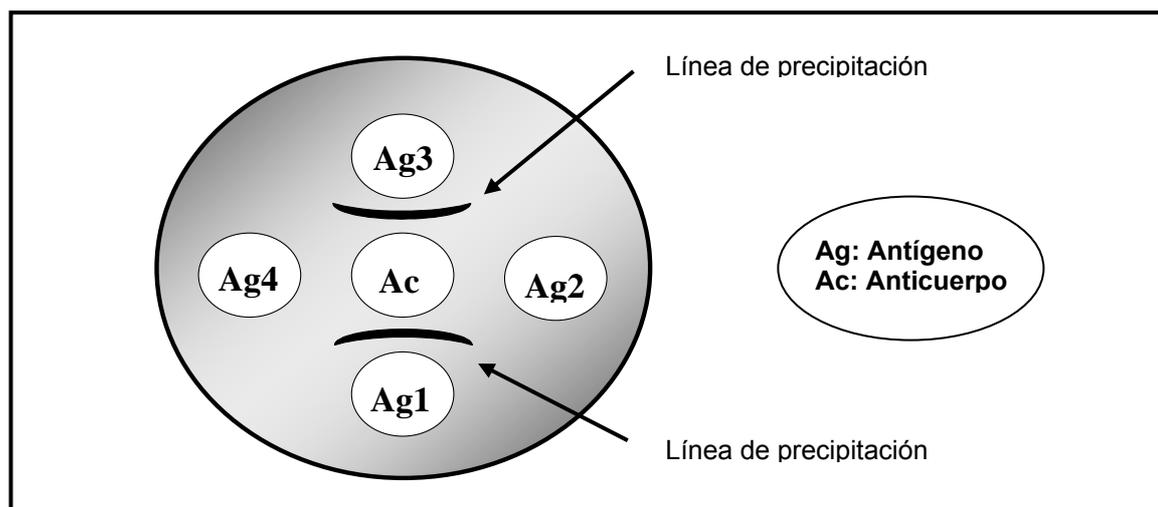


Figura 7. Técnica de inmunodifusión en geles de agar.

Hsieh y col., (1995) identificaron vaca, cerdo y caballo en carnes frescas empleando la técnica de inmunodifusión en gel de agar. El límite de detección para las muestras frescas que contenían vaca y cerdo fue del 2-3%.

Martin y col., (1998) detectaron mediante esta técnica la presencia de carne de cerdo en muestras frescas de vaca. El límite de detección del ensayo fue del 3-5%.

En esta técnica, los reactivos se pueden inmovilizar en discos de papel de filtro, de modo que todos los componentes de la reacción (placas de agar, plantilla, discos de inmunosuero y de referencia) se pueden suministrar en forma de kit. La realización de la prueba e interpretación de los resultados es muy sencilla.

II.2.3.2. INMUNOELECTROFORESIS

A pesar de que la inmunodifusión permite obtener una línea de precipitación separada para cada antígeno y anticuerpo que se encuentra en una mezcla, a veces resulta difícil separar todos los componentes de una matriz compleja. La inmunoelectroforesis mejora la resolución del sistema, separando los antígenos por electroforesis antes de llevar a cabo la inmunodifusión.

Cordal de Bobbi y col., (1985) utilizaron esta técnica para diferenciar distintas especies animales (vaca, oveja, cerdo, caballo y conejo). Los resultados obtenidos fueron, sin embargo, muy similares a los conseguidos mediante la inmunodifusión en geles de agar.

Reddy y Mandokhot (2002) emplearon la técnica de la inmunolectroforesis para identificar vaca y oveja. El límite de detección fue del 1% en carnes cocinadas y del 2-10% en carnes frescas.

II.2.3.3. TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS (ELISA)

Las técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que constituyen en la actualidad las técnicas inmunológicas más ampliamente utilizadas, se caracterizan por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo.

En estas técnicas, uno de los elementos de la reacción inmunológica (antígeno o anticuerpo) se fija a un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno, polivinilo, polipropileno o nylon, que permiten su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado (Clark y Engvall, 1980). En algunos formatos, como fase sólida se utilizan membranas, generalmente de nitrocelulosa, a las que se unen las proteínas mediante enlaces hidrofóbicos. Este último tipo de ensayo se denomina *Immunodotting*. La interacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la reacción colorimétrica producida por una enzima (conjugada al antígeno o al anticuerpo) al degradar el sustrato correspondiente. La medida de la absorbancia en los pocillos de la placa de ELISA, permite cuantificar la reacción inmunológica. Esto supone una importante ventaja frente a la inmunodifusión y la inmunolectroforesis, que son técnicas cualitativas.

En cuanto a la enzima utilizada en la conjugación al antígeno o al anticuerpo es conveniente que esté purificada, que sea activa, fácil de obtener y que al reaccionar con el sustrato origine un producto fácilmente observable y cuantificable. Las enzimas más utilizadas con este fin son la peroxidasa de rábano, la β -galactosidasa, la glucosa oxidasa y la fosfatasa alcalina (Voller y col., 1986).

La elección del sustrato enzimático es también importante en las metodologías ELISA. El sustrato debe ser estable y soluble, antes y después de su degradación. La enzima peroxidasa de rábano, una de las más empleadas, utiliza como sustrato el peróxido de hidrógeno y como donantes de hidrógeno la orto-fenildiamina (OPD), el ácido 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolina) sulfónico (ABTS), el ácido 5-aminosalicílico y la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). En el caso de la β -

galactosidasa, el sustrato más utilizado es el orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (O-NPG) y para la fosfatasa alcalina el para-nitrofenil (P-NPP) (Tyssen, 1985). Los compuestos donantes de hidrógeno, al oxidarse en presencia del sustrato, originan compuestos coloreados cuantificables espectrofotométricamente.

Las técnicas inmunoenzimáticas se han desarrollado en diversos formatos atendiendo al componente de la reacción que se fija en primer lugar, la fase sólida utilizada y si se emplean o no concentraciones limitantes de antígeno y anticuerpo. En la identificación de especies, los más utilizados son el ELISA indirecto, ELISA competitivo y ELISA *sandwich* (Patterson y Jones, 1990).

En el ELISA indirecto (*Figura 8*), el antígeno se adsorbe a una fase sólida, y el anticuerpo que se añade a continuación, se une al antígeno inmovilizado. El anticuerpo puede estar directamente conjugado a una enzima o bien se incorpora un segundo anticuerpo marcado con una enzima que reconoce como antígeno al anterior. Finalmente, se adiciona el sustrato específico de la enzima. La degradación del sustrato por la enzima produce una reacción colorimétrica cuantificable por espectrofotometría.

La técnica de *Immunodotting* es una modificación del ELISA indirecto en la que el ensayo se lleva a cabo en una membrana de nitrocelulosa en lugar de en una placa de poliestireno. Los sustratos utilizados en el *immunodotting* se diferencian de los usados en la técnica de ELISA, en que el producto de la reacción enzimática es insoluble y precipita en el lugar de formación. De este modo, la reacción inmunológica se aprecia gracias a la formación de una banda teñida.

La técnica del *immunodotting* presenta importantes ventajas frente al ELISA: a la nitrocelulosa se unen e inmovilizan un menor número de moléculas proteicas que a las placas de poliestireno que podrían ser responsables de las reacciones cruzadas, se utiliza menor cantidad de muestra y el ensayo es sencillo y rápido. Su principal inconveniente, sin embargo, es que se trata de una técnica cualitativa.

Macedo-Silva y col., (2000) han conseguido identificar diversas especies de animales de abasto (vaca, pollo, cerdo y caballo) en hamburguesas utilizando la técnica del *immunodotting*.

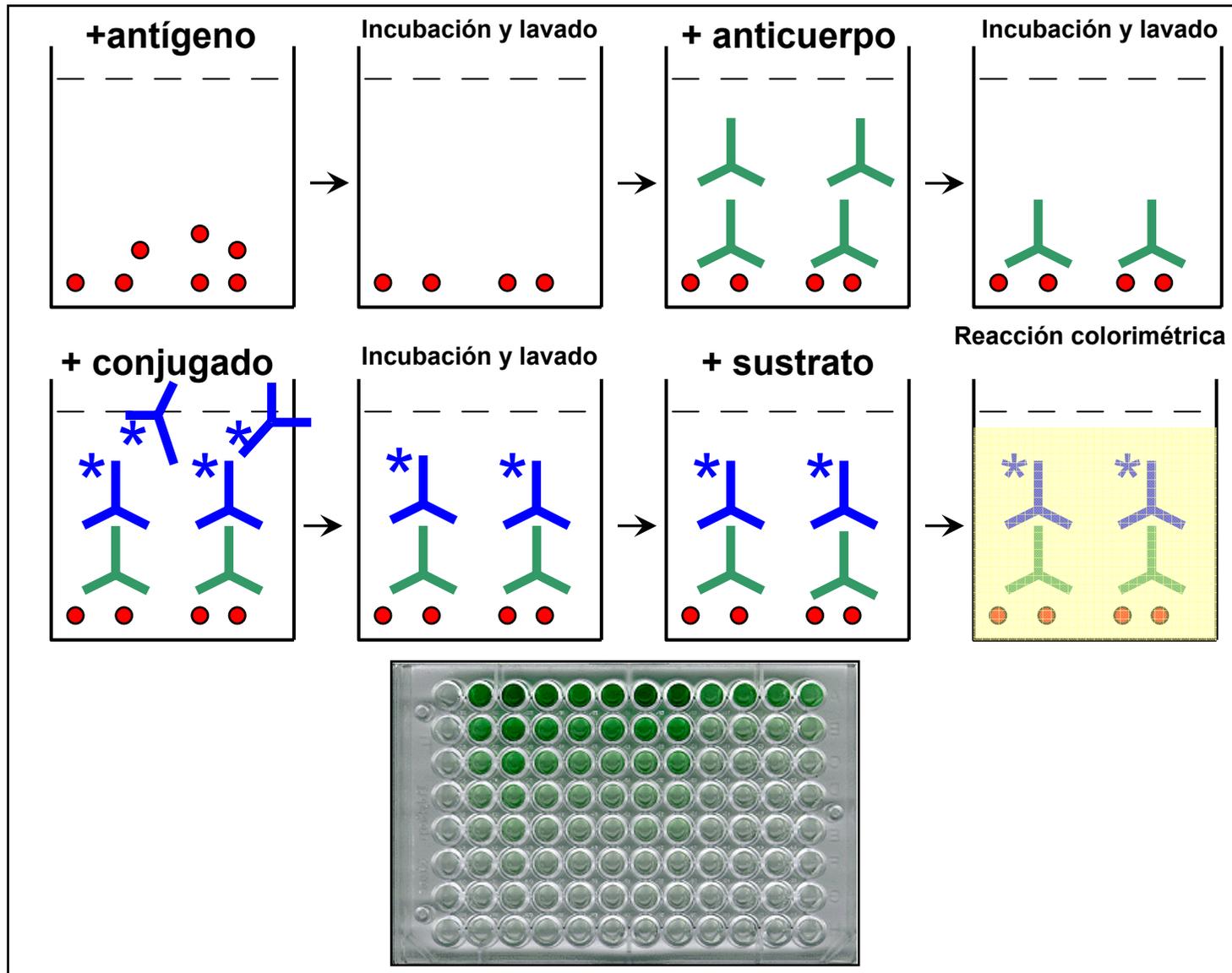


Figura 8. Técnica de ELISA indirecto.

El principal inconveniente que presenta el empleo de anticuerpos policlonales producidos frente a extractos musculares solubles, reside en que en ocasiones son poco específicos y no sólo reconocen la especie frente a la cual se han producido sino también otras (Ayuso y col., 2000; Restani y col., 2002) siendo necesario su purificación.

En el ELISA competitivo, el antígeno purificado se adsorbe a la fase sólida. A continuación, se añaden conjuntamente una muestra que contiene una concentración desconocida de antígeno y un anticuerpo específico marcado con una enzima. Los antígenos presentes en la muestra competirán con los antígenos movilizados por su unión al anticuerpo. Seguidamente, se eliminarán los anticuerpos unidos a los antígenos de la muestra por un lavado. La unión de los anticuerpos a los antígenos adsorbidos a la fase sólida, se mide por la reacción colorimétrica resultante de la adición del sustrato. Cuando la muestra contiene una gran concentración de antígeno, no quedan anticuerpos disponibles para reaccionar con los antígenos inmovilizados y por tanto la reacción colorimétrica es poco intensa. Mientras que cuando el antígeno no está presente en la muestra, se unen una gran cantidad de anticuerpos al antígeno inmovilizado en la fase sólida.

En el ELISA sandwich, se une un anticuerpo a la fase sólida y seguidamente se añade la muestra que contiene el antígeno. Después de un lavado que elimina los antígenos no unidos a la fase sólida, se añade un segundo anticuerpo marcado con una enzima. La unión del segundo anticuerpo al antígeno se cuantifica por la reacción colorimétrica resultante de la degradación por el enzima del sustrato.

Las primeras aplicaciones de las técnicas de ELISA para la detección y cuantificación de carnes de diferentes especies animales en mezclas cárnicas se deben a Kangethe y col., (1982) y Whithaker y col., (1982). En ambos trabajos, se emplearon anticuerpos policlonales obtenidos frente a la albúmina sérica de vaca, oveja, caballo, canguro, cerdo y camello y, mediante un ELISA indirecto, se consiguieron niveles de detección del 3% de estas especies en diversas mezclas cárnicas. Para eliminar las reacciones cruzadas, los anticuerpos se neutralizaron con las correspondientes albúminas heterólogas. El empleo de los anticuerpos policlonales en diversos formatos de ELISA también ha hecho posible la detección y cuantificación de carne de pollo (Martín y col., 1988a), caballo (Martín y col.,

1988b) y cerdo (Martín y col., 1988c) en mezclas de carne, utilizando inmunosueros obtenidos frente a las proteínas sarcoplásmicas del músculo.

Berger y col., (1988) utilizaron anticuerpos policlonales obtenidos frente a proteínas termoestables de músculo esquelético de cerdo y de pollo, para detectar la presencia de estas especies en productos cocinados y enlatados mediante una técnica de ELISA.

Castro y col., (1990) desarrollaron una técnica de ELISA indirecto para detectar y cuantificar la incorporación de carne de pollo en mezclas cárnicas de cerdo o de vaca empleando un anticuerpo monoclonal, que reconocía una de las proteínas musculares solubles de la carne de pollo. El porcentaje de detección de carne de pollo en las mezclas cárnicas estaba comprendido entre el 1 y el 25%.

Andrews y col., (1992) detectaron la presencia de carne de vaca, cordero, caballo y ciervo en productos cárnicos cocinados utilizando una técnica de ELISA sandwich con anticuerpos policlonales específicos de especie. Otras aplicaciones de los enzima inmunoensayos han permitido la detección de carne de pollo recuperada mecánicamente en productos cárnicos empleando anticuerpos frente a proteínas de la médula ósea del pollo (Pickering y col., 1995).

Hsieh y col., (1995) identificaron pollo y oveja en muestras frescas, y vaca, cerdo, caballo, aves y oveja en productos cárnicos curados empleando una técnica de ELISA sandwich. El límite de detección alcanzado fue del 1%.

Billett y col., (1996) utilizaron el formato de ELISA indirecto para la identificación de diferentes aves (pollo, pato, pavo, etc.), empleando para ello anticuerpos monoclonales producidos frente a la proteína desmina del músculo de pollo, separada previamente por SDS-PAGE. De un modo similar, Sheu y Hsieh (1998), obtuvieron anticuerpos monoclonales específicos de varias especies de aves para detectar la adulteración de esas carnes con otras especies. Chen y col., (1998), utilizaron también la técnica de ELISA indirecto para detectar carne de cerdo en mezclas cárnicas frescas y sometidas a diferentes tratamientos térmicos. Para ello, emplearon anticuerpos monoclonales producidos frente a proteínas musculares termoestables de cerdo.

Hsieh y col., (1998) obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a proteínas termoestables que permitieron la detección de carne de vaca, cerdo, cordero, caballo y ciervo en productos cárnicos cocinados mediante un ELISA indirecto no competitivo. Estos anticuerpos no reaccionaron con muestras cárnicas frescas o carne de aves cocinadas (pollo, pavo y pato).

Martin y col., (1998) detectaron la adición de carne de cerdo a muestras frescas de vaca mediante una técnica de ELISA sandwich. El límite de detección del ensayo fue del 1%.

Chen y Hsieh (2000) utilizaron anticuerpos monoclonales obtenidos frente a proteínas musculares termoestables de cerdo, para identificar la presencia de esta especie en muestras cárnicas tratadas térmicamente.

Chen y col., (2002) emplearon diversos anticuerpos monoclonales obtenidos frente a una proteína termoestable (troponina I) y una técnica de ELISA indirecto, para identificar el origen de las distintas proteínas musculares que pueden estar presentes en las harinas de carne.

Hajmeer y col., (2003) utilizaron dos *kits* inmunológicos comerciales para detectar tejido del sistema nervioso central de ganado bovino. El límite de detección obtenido fue del 0,25% con un *kit* y del 0,11% con el otro.

Las técnicas de ELISA se han empleado como un método fiable que permite certificar si las harinas animales reciben el tratamiento térmico que marca la legislación para su posterior eliminación (von Holst y col., 2000; Bjorklund y col., 2001).

II.3. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES ANIMALES BASADAS EN EL ADN

Entre las técnicas rápidas de reciente aplicación al análisis de los alimentos se encuentran las genéticas, que se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en los seres vivos. De estas técnicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más utilizada y permite obtener millones de copias de una secuencia específica de ADN mediante una simple reacción enzimática. Esta técnica se ha convertido en una herramienta de gran

utilidad para el control de la calidad de nuevos productos en la industria alimentaria, ya que permite identificar el origen de muchos de los componentes presentes en los alimentos (Bottero y col., 2002; Verkaar y col., 2002) así como detectar y cuantificar microorganismos de interés higiénico-sanitario (Boyapalle y col., 2001; Kimura y col., 2001). Los métodos genéticos de identificación de especies, a pesar de ser más caros y exigir un mayor soporte técnico, presentan importantes ventajas con respecto a los métodos de análisis de proteínas (*Tabla 7*).

Conviene señalar que las técnicas basadas en el ADN son especialmente útiles cuando se analizan productos sometidos a tratamientos térmicos intensos, debido a la estabilidad del ADN en dichos procesos (Kangethe y col., 1986).

Características del genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial de los animales es una pequeña molécula de ADN bicatenario circular, aunque se conocen dos organismos en los que aparece como una molécula lineal, de la que existen muchas copias dentro de la mitocondria. Dependiendo del tipo de célula se pueden encontrar hasta incluso mil copias. El tamaño del genoma mitocondrial en los animales se estima en unos 16.500 ± 500 pares de bases (pb), aunque existen variaciones tanto intraespecíficas como interespecíficas (Moritz y col., 1987; Avise y col., 1987).

Además de por su menor tamaño (aproximadamente cinco órdenes de magnitud), número de copias (se suelen encontrar una o dos copias de ADNn en cada célula) y disposición (el ADNn es lineal), el ADNmt es un sistema génico que se diferencia del nuclear en algunos aspectos:

- Se trata de un ADN haploide y no recombinante. Salvo alguna excepción en la que se ha demostrado herencia paterna (Saavedra y col., 1997), el ADNmt es casi exclusivamente de herencia materna.
- Es un ADN muy compacto y de gran eficiencia: no contiene intrones, raramente aparecen secuencias duplicadas y no hay apenas espacios intergénicos; los genes suelen estar separados por menos de 10 pb o incluso se solapan entre sí.

Tabla 7. Comparación entre los métodos de análisis de proteínas y los métodos genéticos para la identificación de especies animales

Métodos basados en el análisis de proteínas	
Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> • Rapidez en el análisis de las muestras • Menor coste de los reactivos • Técnicas más sencillas de aprender • Amplia disponibilidad de datos para muchas especies • Técnicas en general más baratas 	<ul style="list-style-type: none"> • Es imposible en ocasiones analizar muestras sometidas a procesados intensos o a tratamientos de esterilización • La conservación de las muestras ha de hacerse en buenas condiciones para obtener resultados reproducibles • Se requiere gran cantidad de muestra • El análisis de los perfiles obtenidos es bastante complejo • Las proteínas varían (en cantidad y en tipo) dependiendo del tejido que se examine
Métodos genéticos	
Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> • Se necesita muy poca cantidad de muestra (unos 100 mg de tejido) • Se pueden analizar muestras conservadas en malas condiciones durante mucho tiempo • Es posible analizar muestras sometidas a intensos procesados, e incluso esterilizadas • Se pueden detectar mutaciones silentes (imposibles de detectar mediante análisis de proteínas) • El ADN es el mismo en todos los tipos celulares de un organismo 	<ul style="list-style-type: none"> • El análisis es relativamente lento y caro • Técnicas más complejas, que necesitan por tanto de personal más especializado • Existe menos información disponible

- Tiene una tasa de evolución de 5-10 veces mayor que el ADNn, debido a una mayor frecuencia tanto de mutaciones puntuales como de inserciones y deleciones (Brown y col., 1979).

El ADNmt de los animales comprende 13 genes que codifican proteínas, 2 genes que codifican ARNs ribosómicos (ARNr 12S y ARNr 16S), 22 genes que codifican ARNs de transferencia (ARNt) y una región no codificante, denominada *región control* en los vertebrados, que contiene los sitios de iniciación para la replicación y la transcripción (*Figura 9*). Los genes mitocondriales codifican distintas subunidades de enzimas que intervienen en la cadena transportadora de electrones: siete subunidades de la NADH deshidrogenasa (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6), el citocromo b, tres subunidades de la citocromo c oxidasa (CO I, II y III) y una o dos subunidades de la ATP sintetasa (ATPasa 6 y en ocasiones también la 8). Obviamente, se requieren muchas más proteínas para el correcto funcionamiento de la maquinaria bioquímica de la mitocondria, pero estas son importadas desde el citoplasma. Aparentemente, el genoma mitocondrial actual es el resultado de una progresiva simplificación del ADNmt primitivo, más complejo, mediante transferencia progresiva de genes al núcleo celular.

El orden de los genes mitocondriales parece variar muy poco entre los vertebrados. Sin embargo, Quinn y Wilson (1993) estudiaron el orden de nueve genes mitocondriales en aves (oca, pato, pollo y codorniz), y observaron diferencias respecto al de los mamíferos. Las diferencias más comunes se deben a transposiciones de los genes que codifican los ARNt. La falta de espacios intergénicos y de intrones podría ser la causa de dicha estabilidad, ya que hace que sea más difícil una reorganización de los genes. Las dos cadenas del ADNmt se denominan *L* (ligera) y *H* (pesada). Su denominación responde a las marcadas diferencias existentes en las dos hebras en el contenido de G+T, lo cual determina un comportamiento diferente de ambas cadenas en los gradientes de CsCl₂. De los 37 genes estructurales que comprende el ADNmt de los vertebrados, sólo la proteína ND6 y ocho ARNt están codificados por la cadena ligera; el resto se codifican en la cadena pesada (*Figura 9*).

Inicialmente se pensó que el ADNmt era una molécula muy conservada ya que codifica proteínas que desempeñan funciones esenciales en el metabolismo celular, por lo que sorprendió que su tasa de evolución fuera mayor que la del ADNn. Sin embargo, no todos los genes mitocondriales acumulan mutaciones con la misma velocidad. La región control es la zona con mayor tasa de evolución. Los genes que codifican proteínas evolucionan más lentamente que aquellos que codifican ARNt y ARNr. En los genes que codifican proteínas se producen sobre todo sustituciones en la tercera base de los codones, siendo mucho más frecuentes las transiciones que las transversiones. En la mayoría de los casos dan lugar a mutaciones silentes. Aparecen muy pocas deleciones y adiciones de nucleótidos, que son más frecuentes en la región control y en los genes que codifican ARNt y ARNr. Aunque cada gen en particular tiene su propia tasa de evolución, los genes que codifican las distintas subunidades de la CO y el citocromo b son los más conservados, mientras que los que codifican las distintas subunidades ND y la ATPasa son los que más varían. La región control, especialmente la zona denominada D-loop, es la parte del ADNmt con mayor tasa de evolución. Esta mayor tasa se debe sobre todo a sustituciones, adiciones y deleciones, siendo la zona responsable de las variaciones en longitud que presenta el genoma mitocondrial en los distintos vertebrados (Meyer, 1993).

Conviene señalar que el código genético mitocondrial, además de no ser idéntico en todas las especies, es más degenerado que el nuclear.

En los vertebrados, las diferencias más notables incluyen la utilización del codón *TGA* como *triptófano* (en lugar de codón de terminación) y del codón *ATA* como *metionina* en vez de *isoleucina*. El código genético mitocondrial requiere a su vez la presencia de un menor número de ARNt. De hecho, normalmente se suelen encontrar sólo 22 tipos de ARNt en la mitocondria en lugar de los 24 que serían necesarios. Ello puede deberse a que los codones *AGA* y *AGG* no se utilizan como arginina sino como codones de terminación en los mamíferos y en los anfibios. Es frecuente a su vez que algunos genes mitocondriales carezcan de un codón de terminación completo, por ejemplo *TAA*, terminando simplemente en *T* o en *TA*.

II.3.1. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

La técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) permite diferenciar distintos organismos mediante el análisis de patrones de bandas, derivados de la ruptura de sus respectivos ADNs. Estos patrones, conocidos como *perfiles de restricción del ADN*, se originan gracias a la actividad de unas enzimas, las *endonucleasas de restricción*.

Las endonucleasas son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster de la molécula de ADN en determinadas secuencias nucleotídicas, específicas para cada enzima, denominadas *dianas de restricción*. Los sitios de reconocimiento de estas enzimas suelen ser secuencias cortas, de unos 4-6 pb. En general, cuanto menor es el tamaño de la secuencia diana, mayor es el número de fragmentos que se generan. En la actualidad se han purificado un gran número de enzimas de restricción diferentes, procedentes de numerosas bacterias. Estas enzimas sirven en la naturaleza para proteger a las bacterias de la penetración de ADN extraño, como el de un fago, puesto que son capaces de destruirlo. Las endonucleasas de restricción se nombran con tres o cuatro letras que proceden del nombre de la bacteria en la que se han aislado (por ejemplo, la enzima *Eco* procede de *Escherichia coli*) y además se les añade un número romano (*Eco RI*, *Eco RII*, *Eco 47III*, *Eco NI*, *Eco 0109I*), puesto que se pueden encontrar varias enzimas de restricción diferentes, que reconocen distintas dianas, en la misma bacteria (Puertas, 1992).

Cuando se incorporan endonucleasas de restricción a los ADNs procedentes de varios individuos, se pone de manifiesto el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Esto se debe a que en los distintos individuos hay variación en los lugares del ADN en los que se encuentran las dianas de restricción, originándose fragmentos de distinta longitud. Los fragmentos se pueden separar después mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, obteniéndose perfiles de restricción característicos. Se pueden conseguir perfiles muy diversos dependiendo del número y tipo de enzimas de restricción empleadas, así como de la utilización de ADNn o ADNmt, aunque el más utilizado ha sido el ADNmt. La comparación entre dichos perfiles de restricción nos puede permitir

diferenciar varias especies entre sí, o incluso poblaciones dentro de una misma especie.

El alto grado de variabilidad genética que se puede analizar con la técnica de RFLP ha determinado su aplicación directa al estudio de poblaciones, utilizando fundamentalmente el ADNmt. En algunas ocasiones se ha empleado también el ADNn para el estudio de poblaciones, ya que la información contenida en el mitocondrial no es suficiente para resolver el problema de las hibridaciones entre especies (Yoshizaki y col., 1997).

La técnica de RFLP, sin embargo, apenas se ha aplicado directamente a la identificación de especies de animales de abasto. Choi y col., (1997) identificaron ganado vacuno nativo de Corea gracias a los perfiles de restricción de sus respectivos ADNs nucleares, empleando las enzimas *PstI*, *MspI*, *HaeIII* y *TaqI*. Fairbrother y col., (1998a) identificaron cerdo, vaca, oveja, pollo y caballo mediante RFLP del ADN nuclear, con las endonucleasas *BamHI*, *PstI*, *EcoRI* y *HindIII*.

La escasa utilización de la técnica de RFLP en la identificación de especies de animales de abasto se debe fundamentalmente a dos razones: la complejidad de los perfiles obtenidos debido al gran número de bandas de ADN que es preciso examinar y la dificultad que presenta, sobre todo en cuanto a tiempo y cantidad de muestra, la extracción de ADN suficiente para llevar a cabo este tipo de análisis. Por otro lado, la aplicación de esta técnica se vería limitada a la identificación de especies en productos frescos o congelados, ya que en caso contrario, la fragmentación del ADN durante el tratamiento térmico impediría la obtención de resultados reproducibles. No obstante, el uso de la técnica de RFLP junto con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP) sí que ha encontrado un amplio campo de aplicación en la identificación de especies animales, como veremos posteriormente.

II.3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Ideada por el científico Kary Mullis a mediados de los 80 y más conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la reacción en cadena de la polimerasa ha cambiado el curso de las ciencias biológicas y biomédicas más que cualquier otra técnica inventada durante el siglo XX. El gran éxito científico de la PCR reside en

que permite obtener *in vitro* un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN, basándose en un principio muy sencillo: la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular.

La reacción en cadena de la polimerasa consiste en la repetición cíclica de tres etapas (*Figura 10*) (Watson y col., 1992):

- **Desnaturalización del ADN bicatenario** presente en la muestra para separar las dos cadenas, mediante la aplicación de temperaturas superiores a 90°C.
- **Unión específica de los cebadores** (oligonucleótidos sintéticos) a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. La temperatura a la que se realiza esta unión (T_a , *annealing temperature*) es muy importante para controlar la especificidad de la reacción. La T_a depende de la composición de bases y del tamaño de los cebadores. Se suelen emplear dos cebadores que se unen cada uno a una cadena diferente delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar. La selección de dichos cebadores constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR.
- **Extensión de la cadena de ADN a copiar** a partir de los cebadores, utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Dicha extensión la lleva a cabo la enzima ADN polimerasa, que inicia su actividad tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de ADN de la muestra.

La polimerasa empleada inicialmente, procedente de *Escherichia coli*, se desnaturalizaba cuando se sometía a temperaturas superiores a 90°C durante la primera etapa de cada ciclo y por lo tanto, había que reponerla al inicio de cada fase de extensión. En la actualidad, sin embargo, se utilizan enzimas termoestables como la *Taq* polimerasa (Saiki y col., 1988), procedente del microorganismo termófilo *Thermus aquaticus*.

Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN diana delimitada por la pareja de cebadores específicos. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en los subsiguientes ciclos, la cantidad de ADN generado se incrementa exponencialmente. De este modo, al final de n ciclos el número de copias de ADN por cada molécula será de 2^n .

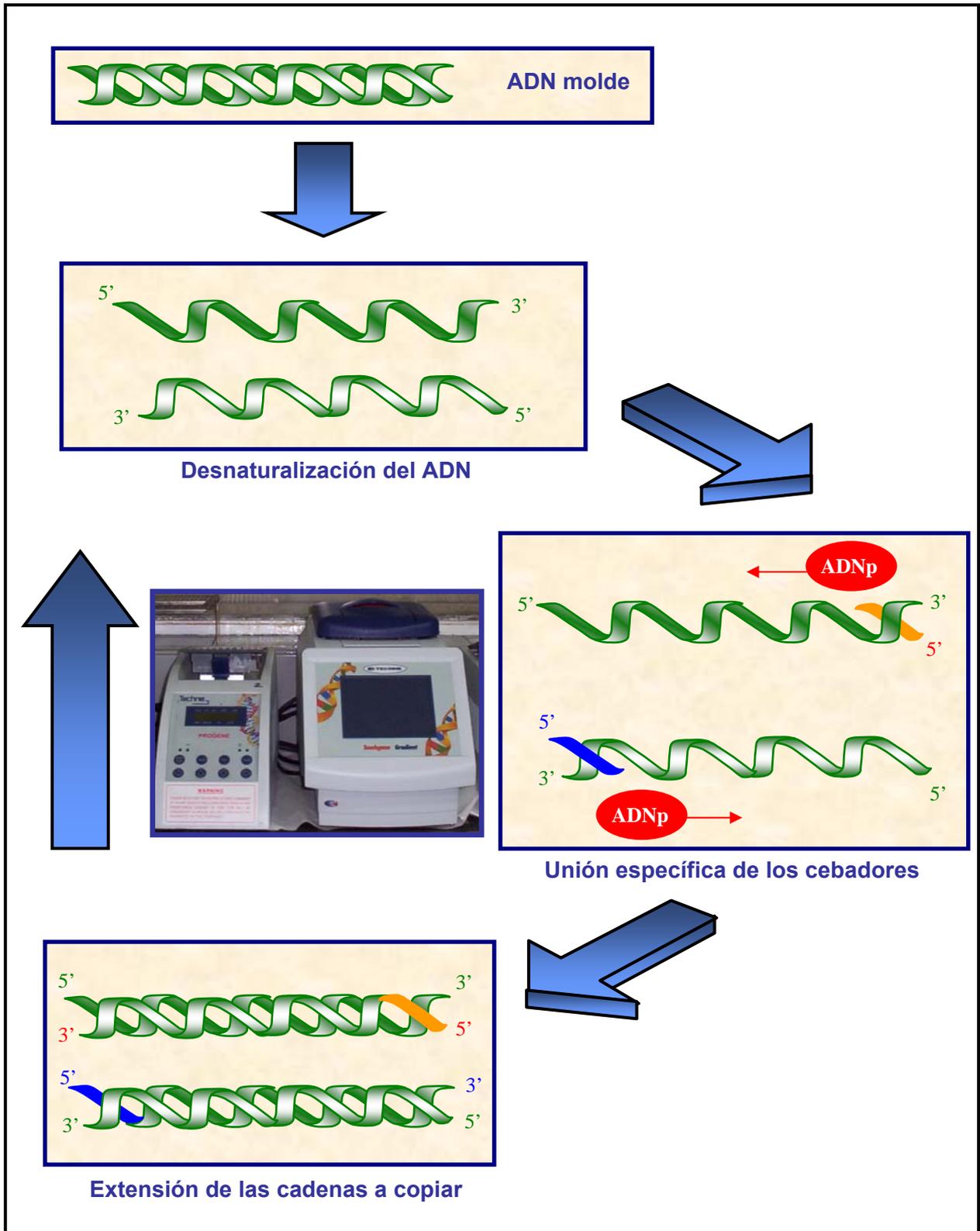


Figura 10. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Un proceso de PCR típico, de entre 20 a 40 ciclos, permite amplificar por tanto un millón de veces como mínimo el número de copias del fragmento de ADN diana que exista en la muestra original. Los fragmentos amplificados se detectan fácilmente mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es una sustancia fluorescente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del ADN, posibilitando su visualización cuando se ilumina con luz ultravioleta. Cuando los fragmentos esperados son de un tamaño muy pequeño se pueden emplear también geles de poliacrilamida.

La utilización de polimerasas termoestables junto con el diseño de termocicladores, aparatos que permiten llevar a cabo los ciclos de tiempo y temperatura necesarios de un modo rápido, han permitido la completa automatización de la técnica de PCR, facilitando así su empleo rutinario. Otro factor clave para la expansión de esta técnica ha sido la creciente disponibilidad de cebadores específicos, posibilitada tanto por los avances en las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos que han permitido conocer las secuencias de un número considerable de genes, como por el desarrollo de equipos y reactivos que permiten una síntesis rápida y económica de los mismos (Watson y col., 1992).

La técnica de PCR presenta sin embargo una limitación: es necesario conocer parte de la secuencia que se quiere amplificar, al menos aquellas zonas en las que se van a unir los cebadores. Esto, que en principio podría suponer un importante obstáculo a la hora de amplificar ADNs desconocidos, se ha conseguido resolver siguiendo distintas estrategias. Por un lado, se pueden utilizar las secuencias génicas de diversas especies conocidas para buscar regiones conservadas sobre las que diseñar cebadores denominados *universales*, que permitan la amplificación del mismo gen en una gran variedad de especies (Kocher y col., 1989; Bartlett y Davidson, 1992; Meyer y col., 1995). En otras ocasiones, es posible conocer la secuencia aminoacídica de la proteína que codifica un determinado gen. En estos casos, se pueden diseñar cebadores que amplifiquen dicho gen basándose en el empleo de codones de la especie que estamos estudiando y en posibles homologías con genes similares que hayan sido secuenciados en otras especies (Venkatesh y Brenner, 1997).

Meyer y col., (1994) identificaron la presencia de carne de cerdo en productos cárnicos tratados por calor amplificando un fragmento de 108 pb del gen que codifica para la hormona de crecimiento (GH). El límite de detección del ensayo fue de aproximadamente el 1%.

Fairbrother y col., (1998b) aplicaron la técnica de PCR para identificar en productos cárnicos la presencia de carne de vaca, pollo, oveja, cerdo y caballo, mediante el empleo de la familia multigénica de las actinas.

Matsunaga y col., (1999) emplearon una técnica de PCR múltiple para la identificación simultánea de carne de cabra, pollo, vaca, oveja, cerdo y caballo en productos tratados por calor, mediante la amplificación de fragmentos específicos de especie en el gen citocromo b (entre 157 y 439 pb). El límite de detección fue de 0,25 ng para todas las especies analizadas.

Wang y col., (2000) diseñaron un método de PCR para la detección de material bovino en piensos animales con un límite de detección del 0,125%, empleando los cebadores diseñados por Tartaglia y col., (1998).

Bania y col., (2001) aplicaron la técnica de PCR para detectar la adulteración de leche de cabra con leche de vaca. Para ello, emplearon los cebadores diseñados por Matsunaga y col., (1999) en el gen citocromo b, para amplificar un fragmento de 274 pb en las muestras de leche de vaca. El límite de detección del ensayo fue del 0,1%. Asimismo, Maudet y Taberlet (2001) detectaron la presencia de leche de vaca en quesos de cabra mediante la amplificación de un fragmento de 413 pb de la región control del ADN mitocondrial en las muestras de vaca.

Colgan y col., (2001) detectaron en piensos la presencia de ADN de vaca, oveja, cerdo y pollo, mediante el diseño de cebadores específicos de especie en el gen mitocondrial ATPasa 8. El límite de detección del ensayo fue del 0,3% para las muestras que contenían vaca y oveja y del 1% para las muestras con cerdo.

Herman (2001) utilizó la técnica de PCR para identificar cinco especies de mamíferos de gran importancia comercial: vaca, oveja, cerdo, pollo y pavo, mediante el diseño de oligonucleótidos especie-específicos para cada una de ellas en el gen mitocondrial citocromo b.

Krcmar y Rencova (2001) detectaron ADN bovino en piensos mediante la amplificación de un fragmento de 271 pb que codifica para el extremo 3' de ARNt^{Lys}, la subunidad 8 ATPasa y la porción aminoterminal de la subunidad 6 ATPasa. El límite de detección fue del 0,125%, similar al obtenido por Tartaglia y col., (1998). Posteriormente, Krcmar y Rencova (2003) amplificaron fragmentos comprendidos entre 145 y 313 pb de los mismos genes mitocondriales para detectar ADN de ovino, caprino y pollo en piensos. El límite de detección fue del 0,01%.

Calvo y col., (2001a) seleccionaron un fragmento de 161 pb, para identificar específicamente ADN de cerdo en una gran variedad de productos cárnicos frescos y tratados por calor, entre los que se incluyen hamburguesas, patés y salchichas.

Kingombe y col., (2001) seleccionaron un fragmento de 274 pb en el gen citocromo b, para la detección de material bovino en piensos sometidos a distintos tratamientos térmicos.

Colombo y col., (2002b) determinaron el porcentaje de ADN de cerdo y oca presente en mezclas binarias de estas especies, utilizando una técnica de PCR múltiple en un fragmento del gen citocromo b.

Calvo y col., (2002a) emplearon una región repetida del ADN (satélite 1709) para identificar la presencia de carne de vacuno en salchichas y productos enlatados, mediante la amplificación de un fragmento de 84 pb. El límite de detección alcanzado fue del 0,01% para la detección de vaca en productos frescos y del 1% en los tratados por calor.

Rajapaksha y col., (2002) amplificaron mediante PCR un fragmento específico de aproximadamente 450 pb en el gen citocromo b para diferenciar carne de animales salvajes (ciervo axis, ciervo porcino, sambar y muntjak) de la de otras especies como vaca, cabra, búfalo, cerdo, perro y oveja.

Lockley y Bardsley (2002) utilizaron el gen de la α -actina para amplificar un fragmento específico de 372 pb en el pollo y de 159 pb en el pavo. Mientras que Hird y col., (2003) utilizaron el gen citocromo b para amplificar un fragmento de 120 pb y 101 pb en las muestras de pollo y pavo, respectivamente, tanto en productos frescos como tratados térmicamente.

Bellagamba y col., (2003) emplearon el gen 12S ARNr para la amplificación mediante PCR de fragmentos específicos de rumiantes (231pb), cerdo (186 pb) y aves de corral (256 pb). El límite de detección del ensayo en las harinas de pescado que analizaron fue del 0,125% para las muestras de vaca, oveja, cerdo y pollo y del 0,5% para las muestras de cabra. Asimismo, han desarrollado una técnica de PCR múltiple para la detección simultánea de ADN de rumiantes y cerdo que tiene un límite de detección de 0,25%.

Bottero y col., (2003) desarrollaron una técnica de PCR múltiple, utilizando los genes mitocondriales 12S y 16S ARNr, para identificar la presencia de vaca, oveja y cabra en muestras de leche y queso.

Wan y Fang (2003) utilizaron un fragmento del gen citocromo b de 408 pb, para identificar específicamente muestras de tigre y evitar su comercialización ilegal.

A pesar de su simplicidad, la identificación de especies animales mediante PCR sin el apoyo de ninguna otra técnica complementaria presenta el inconveniente de que es necesario conocer previamente las secuencias de las especies que se pretenden diferenciar, a fin de poder diseñar oligonucleótidos específicos para cada una de ellas. Aunque en la actualidad esto es más sencillo gracias a las cada vez más amplias bases de datos disponibles, en ocasiones es imposible de llevar a cabo ya que hay algunas especies animales de las que no se conoce ninguna secuencia.

El uso combinado de la PCR con otras técnicas complementarias, como la secuenciación, la técnica de RFLP, RAPD o la técnica de SSCP, han hecho posible la identificación de un gran número de especies.

II.3.3. SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS POR PCR

Este método de identificación de especies consiste en la amplificación de un determinado fragmento génico por PCR y su posterior secuenciación. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas se pueden identificar diferencias interespecíficas que permitan distinguir las especies estudiadas.

Para seleccionar adecuadamente la región del genoma que se debe amplificar es preciso tener en cuenta varias premisas (Bartlett y Davidson, 1992):

- Debe acumular mutaciones con suficiente rapidez para que organismos estrechamente relacionados tengan diferentes secuencias nucleotídicas, pero con la suficiente lentitud para que la variación intraespecífica no sea importante.
- El tamaño del segmento de ADN ha de ser lo bastante largo para detectar diferencias en la secuencia entre especies próximas, pero suficientemente corto para poder secuenciarla en un gel estándar de secuenciación.
- Debería elegirse un gen que codifique por una proteína. De este modo, los errores de amplificación y/o secuenciación pueden detectarse traduciendo la secuencia de nucleótidos y comparándola con la secuencia aminoacídica.
- La existencia de secuencias del gen seleccionado en las bases de datos correspondientes a otros organismos sería de gran interés, ya que nos permitiría comparar dichas secuencias con las obtenidas en nuestro estudio.

El análisis de las secuencias obtenidas suele requerir la utilización de programas informáticos complejos. Bartlett y Davidson (1992) fueron los primeros en introducir un programa, basado en la elaboración de árboles filogenéticos, que permite comparar la secuencia de la especie problema con la de otras especies previamente secuenciadas e introducidas en la base de datos. Gracias a este programa informático se puede llevar a cabo la identificación de especies en muestras (siempre que en la base de datos haya secuencias correspondientes a las especies que se pretende identificar), así como se pueden establecer relaciones filogenéticas entre especies. Sin embargo, la gran importancia que está adquiriendo la identificación de especies ha hecho que se diseñen otros programas informáticos más específicos, que ya no están basados en la construcción de árboles filogenéticos, sino en la elaboración de matrices de valoración de distancias genéticas entre secuencias (Forrest y Canergie, 1994; Meyer y Candrian, 1996).

El gen mitocondrial que codifica el citocromo b se ajusta muy bien a todas las premisas expuestas anteriormente para la selección del fragmento a amplificar. Por ello ha sido el más utilizado en la identificación de especies animales. Kocher y col., (1989) emplearon los genes mitocondriales que codifican la región control, el citocromo b, y el 12S ARNr para identificar más de cien especies animales, entre las que se incluyen mamíferos, aves, anfibios, pescados y algunos invertebrados.

Las secuencias de estas especies se utilizaron para estudiar las relaciones filogenéticas que existían entre ellas.

Bartlett y Davidson (1992), desarrollaron una técnica de identificación de especies denominada FINS (*Forensically Informative Nucleotide Sequencing*), que básicamente consistía en la construcción de bases de datos con las secuencias de ese fragmento en diferentes especies. Una comparación directa de la secuencia problema con las secuencias patrón, permitía calcular la especie de procedencia de la muestra. Estos autores aplicaron con éxito la técnica de FINS a la identificación de numerosas especies animales.

Forrest y Carnegie (1994), aplicaron el programa DNADIST con secuencias del gen citocromo b para determinar la relación filogenética existente entre especies de carne como el búfalo o el emú. Si las dos especies eran del mismo género, el programa proporcionaba un valor de 0,10; mientras que si se trataba de dos especies no relacionadas, el valor obtenido era de 5,17.

Chikuni y col., (1994a) identificaron distintas especies de mamíferos (vaca, oveja, cabra, cerdo, caballo, conejo y ciervo sika) y aves (pollo, codorniz, gorrión y zorzal), utilizando la técnica de PCR-Secuenciación. Para ello, amplificaron un fragmento de 646 pb del gen citocromo b.

Bataille y col., (1999) identificaron muestras de pollo, caballo, vaca y cerdo, tras secuenciar un fragmento del gen citocromo b de 309 pb.

Hsieh y col., (2001) aplicaron la técnica de PCR-Secuenciación a 111 muestras, a partir de sangre y tejidos pertenecientes a 10 familias y 19 especies diferentes. Para proceder a su identificación, secuenciaron un fragmento de 402 pb en el gen citocromo b.

Colombo y col., (2002a) amplificaron un fragmento de aproximadamente 300 pb en el gen citocromo b, que secuenciaron en tres razas de oca italiana (Paduana, Romana y una procedente de un cruzamiento), ante la falta de secuencias fiables existentes en las bases de datos internacionales. En otro trabajo, Colombo y col., (2004) secuenciaron un fragmento de 282 pb del gen citocromo b para identificar muestras de carne de caza salvaje.

Girish y col., (2004) utilizaron la técnica de PCR-Secuenciación para identificar distintas especies de carne amplificando un fragmento de 456 pb en el gen mitocondrial 12S ARNr.

Algunos fragmentos de genes nucleares también se han utilizado en la diferenciación de especies mediante PCR-Secuenciación. Tal es el caso del gen que codifica la proteína p53. Bucher y col., (1996) amplificaron un fragmento de 1.339 pb, cuya secuenciación permitió la identificación de caballo.

La secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR es, no obstante, una herramienta analítica cara, laboriosa y que requiere personal especializado. No resulta por tanto adecuada para la identificación de especies en laboratorios de análisis de alimentos y control de calidad, en los que se requiere una técnica sencilla, rápida y barata con la que llevar a cabo el análisis rutinario de un gran número de muestras (Tartaglia y col., 1998).

II.3.4. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE REGIONES AMPLIFICADAS POR PCR (PCR-RFLP)

La técnica de PCR-RFLP consiste en el uso combinado de la técnica de RFLP y del PCR. De este modo, se amplifican fragmentos de ADN específicos mediante PCR y posteriormente se tratan con enzimas de restricción, que los cortan en trozos más pequeños. Diferencias en la secuencia nucleotídica entre las distintas especies estudiadas, darán lugar a fragmentos de diferentes tamaños que se examinan mediante electroforesis.

El estudio de los polimorfismos en fragmentos amplificados por PCR (PCR-RFLP) en lugar de en el ADNmt total (RFLP), presenta importantes ventajas en la identificación de especies:

- Los perfiles de ADN obtenidos tras la electroforesis son más sencillos de interpretar, puesto que hay un menor número de bandas.
- Una pequeña cantidad de ADN es suficiente para llevar a cabo el análisis, ya que se obtienen un gran número de copias tras su amplificación por PCR. Esto reduce significativamente la cantidad de muestra necesaria.

- Es posible analizar muestras procesadas, incluso aquellas sometidas a tratamientos de esterilización (Branciani y col., 2000b; Sun y Lin, 2003), si bien la degradación del ADN en estos casos va a limitar el tamaño del fragmento que se podrá amplificar (Unselde y col., 1995).

En la técnica de PCR-RFLP, la elección de las endonucleasas de restricción puede hacerse al azar o puede, por el contrario, estar basada en el conocimiento y comparación previa de las secuencias del fragmento analizado (debido, por ejemplo, a secuencias disponibles en las bases de datos). En cualquier caso, es imprescindible seleccionar enzimas que no presenten variaciones intraespecíficas, lo cual se comprueba mediante el análisis de un número adecuado de muestras. Por otro lado, la eficacia de la técnica de PCR-RFLP va a depender del grado de variabilidad genética de la secuencia elegida, así como de su tamaño. Ambas variables han de ser suficientes para detectar variaciones interespecíficas, pero no intraespecíficas.

Para la identificación de especies mediante PCR-RFLP se han seleccionado zonas conservadas y fragmentos pequeños. Los genes mitocondriales han sido los más utilizados, sobre todo el gen que codifica el citocromo b y en menor medida, el gen que codifica la subunidad 12S del ARNr. Chikuni y col., (1994a), utilizaron un fragmento de 646 pb del gen citocromo b para identificar mediante PCR-RFLP siete especies de mamíferos (vaca, oveja, cabra, cerdo, caballo, conejo y ciervo sika) y cuatro especies de aves (pollo, codorniz, gorrión y zorzal), utilizando las enzimas de restricción *Taq I*, *Alu I* y *Hae III*. Asimismo, en otro trabajo Chikuni y col., (1994b) consiguieron diferenciar carne de oveja y cabra, empleando la enzima de restricción *Apa I*, que escindió un fragmento de 374 pb amplificado entre las bases 145-518 del satélite I del ADN.

Meyer y col., (1995) identificaron veintidós especies animales mediante PCR-RFLP de un fragmento de 359 pb del gen citocromo b. Utilizaron las enzimas *Alu I*, *Rsa I*, *Taq I* y *Hinf I* para diferenciar cerdo, vaca, jabalí, búfalo, oveja, cabra, caballo, pollo y pavo. Además consiguieron diferenciar distintas especies de caza, incluyendo ciervo común, corzo, rebeco, alce común, reno, canguro y antílope en productos marinados y tratados térmicamente.

Borgo y col., (1996), seleccionaron unos fragmentos de 380 pb del gen mitocondrial 12S ARNr y de 440, 471 y 552 pb del gen 16S ARNr para identificar, mediante PCR-RFLP, tres especies de caracol (*Helix pomatia*, *Helix lucorum* y *Achatina fulica*).

Tartaglia y col., (1998), utilizaron la técnica de PCR-RFLP para identificar material bovino en piensos empleados en la alimentación animal. Para ello, amplificaron un fragmento de 271 pb del gen que codifica la subunidad 8 de la ATPasa y la región amino-terminal de la subunidad 6 de la ATPasa.

Guoli y col., (1999) emplearon la enzima *Hae III* para confirmar la especificidad de un fragmento amplificado de 218 pb en el satélite 1.709 en vaca, búfalo y yak.

Wolf y col., (1999) identificaron veinticinco especies animales (ciervo sika, gamo común, íbice, ñu, etc.), mediante PCR-RFLP con diversas enzimas de restricción, en un fragmento de 464 pb del gen citocromo b.

Zimmermann y col., (1999) trataron de identificar diversas especies animales mediante PCR-RFLP, a partir de muestras de carne de vaca, cerdo, perro, visón, etc., utilizando un fragmento de 981 pb del gen citocromo b.

Branciarri y col., (2000a) emplearon la técnica de PCR-RFLP para detectar el origen de la leche utilizada para la producción de queso. Un fragmento de 359 pb amplificado en el gen citocromo b, permitió identificar leche de vaca, cabra, oveja y búfalo mediante los perfiles de restricción obtenidos con las enzimas *Taq I*, *Hae III*, *Hinf I* y *Sau3AI*. En otro trabajo, estos autores utilizaron la misma técnica para identificar diversas especies como la oca, pollo, cabra, vaca, etc., en productos cárnicos tratados por calor (salchichas, carne enlatada, mortadela, salami, etc.) (Branciarri y col., 2000b).

Partis y col., (2000) utilizaron el mismo fragmento de 359 pb del gen citocromo b, junto con las enzimas *Hinf I* y *Hae III*, para identificar diferentes especies animales.

Montiel-Sosa y col., (2000) diferenciaron cerdo y jabalí en productos frescos, curados y cocinados. Para ello, cortaron un fragmento de 531 pb amplificado en la zona D-loop del ADN mitocondrial, con la enzima de restricción *Ava II*.

Bellagamba y col., (2001) identificaron diversas especies (vaca, búfalo, oveja, cabra, cerdo, caballo, pollo y pavo) en piensos y harinas de carne, empleando la técnica de PCR-RFLP en un fragmento de 359 pb del gen citocromo b.

Lahiff y col., (2001) utilizaron las enzimas *Hph I*, *Mnl I*, *Hind III* y *Ssp I* para identificar pollo, vaca, oveja y cerdo en carne y harinas de carne.

Verkaar y col., (2002) describieron dos métodos complementarios para la identificación de ganado vacuno, empleando la técnica de PCR-RFLP. El primer método se basa en la amplificación de regiones de los genes mitocondriales citocromo b y citocromo oxidasa II, mientras que el segundo método, empleado como método confirmatorio y que permite además la detección de híbridos, se realiza en una región del satélite IV del ADN.

Bottero y col., (2002) emplearon el gen mitocondrial citocromo b y la enzima de restricción *Hinf I* para confirmar la identificación específica de vaca y búfala en quesos.

Myers y col., (2003) utilizaron las enzimas *Hinfl* y *HypCH4III* para identificar la presencia de diferentes especies (vaca, oveja, cabra, cerdo, caballo y ciervo) en harinas y piensos animales.

Seyboldt y col., (2003) han utilizado la técnica de RT-PCR seguida de la digestión con diferentes enzimas de restricción para detectar la presencia de tejido nervioso bovino en carne y productos cárnicos.

Sun y Lin (2003) han aplicado la técnica de PCR-RFLP con éxito para identificar carne de vaca, cerdo y cabra, utilizando el gen 12S ARNr. El límite de detección del ensayo al analizar mezclas cárnicas fue del 1%.

Algunos genes nucleares también se han utilizado con éxito en la identificación de especies de carne mediante la técnica de PCR-RFLP. Por ejemplo, el gen que codifica la α -actina, utilizado en la identificación de pollo (Hopwood y col., 1999), o el gen que codifica el factor liberador de la hormona del crecimiento (GnRH), utilizado en la diferenciación de cerdo y vaca (Meyer y col., 1995).

La técnica de PCR-RFLP, a diferencia de la de PCR-Secuenciación, es sencilla, rápida y no requiere el uso de instrumental complejo. Por ello, resulta muy

apropiada para análisis rutinarios en programas de control de calidad (Tartaglia y col., 1998; Branciari y col., 2000a, 2000b).

II.3.5. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO EN LA CONFORMACIÓN DE LAS CADENAS SENCILLAS DE ADN DE REGIONES AMPLIFICADAS POR PCR (PCR-SSCP)

Desde que Orita y col., (1989a, 1989b) pusieron a punto la técnica de SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*), esta se ha utilizado con éxito en un gran número de aplicaciones, aunque la mayoría de ellas dentro del campo de la medicina (Glavac y Dean, 1993). Esta técnica se basa en la relación existente entre la movilidad electroforética de una hebra de ADN monocatenario (ADNmc) y su conformación, que en definitiva es un reflejo de su secuencia nucleotídica. En la técnica de PCR-SSCP, el ADN bicatenario (ADNbc) se desnaturaliza a ADNmc y posteriormente se separan las dos hebras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, bajo condiciones no desnaturalizantes. Cualquier diferencia en la secuencia del ADN va a dar lugar a un cambio en la movilidad de las moléculas de ADNmc, que se visualizará al final del proceso.

La aplicación de la técnica de PCR-SSCP a la identificación de especies animales es bastante reciente. Para lograr este objetivo, se ha utilizado habitualmente la región control, especialmente la zona denominada D-loop, que es la parte del ADNmt con mayor tasa de evolución. Esta mayor tasa se debe sobre todo a sustituciones, adiciones y deleciones.

Así, Takeda y col., (1995) emplearon la técnica de PCR-SSCP sobre un fragmento de 227 pb en el gen mitocondrial que codifica la región D-loop, para identificar polimorfismos en cinco razas porcinas (Landrace, Duroc, Large White, Meishan y el cerdo miniatura de Gottingen). Posteriormente, Marklund y col., (1995) identificaron 15 polimorfismos en cinco razas diferentes de caballos, mediante el mismo gen mitocondrial. Eledath y Hines (1996), utilizaron también la región D-loop para clasificar genotípicamente 16 líneas maternas de raza bovina Holstein. Y, finalmente, Rea y col., (1996) trataron de discriminar muestras de cerdo y de jabalí, mediante PCR-SSCP de tres fragmentos distintos de la región D-loop de 227 pb, 389 pb y 496 pb, aunque sólo obtuvieron patrones diferentes entre las distintas muestras de jabalí.

Nakajima y col., (1996) emplearon la técnica de PCR-SSCP para detectar una mutación en un fragmento de 659 pb del gen rianodina, que está asociado al síndrome de estrés porcino. Los patrones obtenidos con esta técnica en las ocho razas de cerdo estudiadas, fueron idénticos a los obtenidos con la técnica de PCR-RFLP.

Barroso y col., (1998) estudiaron las cuatro variantes alélicas más frecuentes presentes en el gen de la kappa-caseína bovina (A, B, C y E). Cada una de las variantes presentó patrones claramente diferenciables al analizar un fragmento de 453 pb de dicho gen, mediante PCR-SSCP. En un trabajo posterior, estos autores amplificaron cinco fragmentos de 233 pb, 234 pb, 265 pb, 466 pb y 498 pb en el exón VII del gen de la beta-caseína bovina, respectivamente, para identificar cuatro variantes alélicas diferentes (A1, A2, A3 y B) (Barroso y col., 1999).

Palmer y col., (2000) identificaron tres alelos diferentes en el gen de la calpastatina ovina, mediante PCR-SSCP. Esta proteína es un inhibidor de las proteasas dependientes de calcio (mu-calpaína y m-calpaína), y se relaciona directamente con la calidad de la carne.

Martínez y Daniélsdóttir (2000) emplearon el gen citocromo b para identificar tres especies de ballena (rorcual del norte, rorcual rostrado y rorcual común) y una especie de foca, utilizando la técnica de PCR-SSCP.

Laurent y Rodellar (2001) estudiaron las variantes proteicas más frecuentes en el gen de la transferrina (A, D₁, D₂ y E), en ganado vacuno de raza Normanda, empleando la técnica de PCR-SSCP. La transferrina es la proteína responsable del transporte de hierro en la sangre y es polimórfica en muchas especies.

Al igual que en las otras técnicas genéticas estudiadas, la eficacia de la técnica de PCR-SSCP para identificación de especies va a estar condicionada por el grado de variabilidad genética que presente el fragmento del gen seleccionado (Rea y col., 1996). En la técnica de PCR-SSCP es además especialmente importante el tamaño de dicho fragmento, ya que esta técnica no resulta en general adecuada para fragmentos mayores de 300 pb (Rea y col., 1996; Tartaglia y col., 1998). Por otro lado, la selección de genes mitocondriales es muy recomendable en el caso de

análisis de SSCP, puesto que se trata de genes haploides. Los genes nucleares, diploides, dan lugar a 4 bandas de ADNmc, lo que complica los perfiles obtenidos.

No existe, sin embargo, una teoría capaz de explicar y predecir la conformación de las moléculas de ADNmc en base a su secuencia, o la movilidad de dichas moléculas en función de su conformación; la técnica de PCR-SSCP es una técnica bastante empírica (Rea y col., 1996). Se han publicado diversos trabajos que estudian las condiciones que afectan a la proporción de mutaciones detectadas mediante SSCP: temperatura, concentración del gel, proporción acrilamida/bisacrilamida, tipo de solución desnaturizante empleada, adición de distintos compuestos al gel, etc. (Fujita y Silver, 1994; Nakajima y col., 1996), pero los resultados aunque válidos en las secuencias estudiadas, no son extrapolables a otros fragmentos. Por tanto, la obtención de resultados reproducibles va a estar condicionada por el desarrollo de la técnica bajo condiciones controladas, siendo además muy importante la utilización de patrones de muestras de referencia.

La técnica de PCR-SSCP presenta importantes ventajas en la identificación de especies animales, con respecto al resto de técnicas genéticas empleadas: (a) se pueden analizar fragmentos de ADN pequeños, procedentes de muestras degradadas durante el procesado; se han conseguido identificar especies animales en muestras sometidas incluso a tratamientos de esterilización (Tartaglia y col., 1998; Martínez y Daníelsdóttir, 2000); (b) permite detectar cualquier diferencia en una sola base, lo cual supone una ventaja frente a la técnica de PCR-RFLP que está condicionada por la existencia de enzimas de restricción que tengan su diana en el lugar de la mutación (Oohara, 1997); (c) su gran poder de detección de mutaciones la hace también muy adecuada para la identificación de especies muy próximas (Barroso y col., 1998), en las que se pueden encontrar muy pocas diferencias en las secuencias; (d) los perfiles de bandas de ADN que se obtienen son sencillos de interpretar debido al reducido número de bandas que presentan; (e) las mutaciones se detectan mediante cambios en la movilidad de las moléculas, no mediante ausencia de señal como sucede en otras técnicas genéticas, por lo que un fallo en la amplificación por PCR no da lugar a falsos positivos; y (f) es una técnica sencilla y rápida por lo que, al igual que la técnica de PCR-RFLP, resulta muy adecuada para análisis rutinarios en programas de control de calidad.

II.3.6. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DEL ADN AMPLIFICADO CON CEBADORES ARBITRARIOS (RAPD)

La técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), denominada también por otros autores AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) o DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*), fue descrita simultáneamente por dos grupos de investigadores en 1990 (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col., 1990). Esta técnica se basa en la amplificación simultánea de múltiples fragmentos del ADN mediante PCR, utilizando para ello un único cebador, normalmente de 9-15 bases, cuya secuencia se escoge al azar. Las temperaturas de unión (T_a) empleadas en la técnica de RAPD son mucho más bajas que en una PCR tradicional (35-39°C), lo cual favorece la inespecificidad de la reacción. Los fragmentos amplificados se analizan normalmente mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio, aunque se pueden analizar utilizando geles de poliacrilamida y tinción con plata, si se quiere obtener mayor resolución (Bowditch y col., 1993).

El número y tamaño de los fragmentos amplificados a partir de un determinado ADN mediante RAPD, se mantiene constante siempre que se utilice el mismo cebador y se haga el análisis en las mismas condiciones. De este modo, los perfiles obtenidos mediante RAPD pueden permitir la diferenciación de los ADNs a nivel de especie, o incluso a nivel de individuo (Sharma y col., 2001; Bednarczyk y col., 2002).

La identificación de especies animales mediante RAPD presenta importantes ventajas: (a) no es necesario conocer previamente las secuencias de ADN que se pretenden amplificar, ya que el diseño del cebador es arbitrario (Martínez y Daníelsdóttir, 2000); (b) se necesita muy poca cantidad de muestra; (c) permite examinar un gran número de polimorfismos en el ADN (Noti y Reinemann, 1996); esto resulta muy importante en la identificación de especies íntimamente relacionadas (Comincini y col., 1996), o en especies que presentan un bajo nivel de variabilidad genética (Bednarczyk y col., 2002); y (iv) es una técnica sencilla, rápida y barata, ya que no requiere el uso de ningún aparato especial.

El principal inconveniente de la técnica de RAPD reside en la dificultad de obtener resultados reproducibles. La amplificación ha de desarrollarse bajo condiciones estrictamente controladas y estandarizadas. Cualquier modificación en la

temperatura, número de ciclos, concentración de reactivos, o incluso en el aparato utilizado, puede alterar los perfiles obtenidos (Noti y Reinemann, 1996). Es además especialmente importante que el ADN de partida tenga una calidad razonable, ya que de lo contrario los resultados no serán reproducibles (Martínez y Malmheden Yman, 1998). La utilización de patrones de muestras conocidas es por tanto necesaria para poder comparar los resultados con las muestras analizadas (Koh y col., 1998).

La falta de reproducibilidad en la técnica de RAPD puede dificultar en gran medida la comparación de resultados entre diversos laboratorios de análisis. Aunque algunos autores afirman que dicha reproducibilidad se puede conseguir mediante una estandarización rigurosa del protocolo (Comincini y col., 1996; Martínez y Daníelsdóttir, 2000), incluso partiendo de ADN ligeramente degradado (Martínez y Malmheden Yman, 1998), otros investigadores no han conseguido obtener unos resultados reproducibles (Jones y col., 1997).

A pesar de su reciente introducción, la técnica de RAPD se ha utilizado con éxito en numerosos trabajos de identificación de especies de animales de abasto. Noti y Reinemann (1996) identificaron cuatro especies de mamíferos utilizando cebadores de 18 y 24 nucleótidos.

Lee y Chang (1994) aplicaron la técnica de RAPD a la identificación de diversas especies animales como vaca, cabra, cerdo, pollo, etc. Obtuvieron perfiles específicos para cada una de las especies empleando un cebador de 10 nucleótidos.

Cushwa y col., (1996) identificaron y mapearon el genoma ovino mediante RAPD. Utilizaron 131 cebadores diferentes de 10 nucleótidos de longitud.

Comincini y col., (1996) consiguieron identificar cinco especies de la familia de los cérvidos: ciervo sika, gamo común, corzo, muntjak indio y ciervo mulo, mediante los perfiles de bandas de ADN obtenidos por RAPD, empleando ocho cebadores de tamaños comprendidos entre 19 y 26 bases.

Smith y col., (1996) utilizaron la técnica de RAPD para evaluar la diversidad genética existente en cuatro razas de pollo y dos poblaciones de pavo. Para ello emplearon 60 cebadores diferentes (de 10 nucleótidos).

Koh y col., (1998) identificaron diez especies animales mediante PCR-RAPD: jabalí, cerdo, caballo, búfalo, vaca, perro, gato, conejo, canguro y venado. Utilizaron 29 cebadores de 10 nucleótidos de longitud, con un contenido en guanina-citosina comprendido entre 50 y 80%. En algunos casos, la discriminación fue difícil de realizar, como entre jabalí y cerdo o entre vaca y búfala.

Martínez y Malmheden Yman (1998) son los autores que han realizado el estudio más amplio de identificación de especies animales mediante RAPD. Estos investigadores examinaron 12 especies de interés comercial (vaca, cabra, cerdo, caballo, etc.), obteniendo perfiles específicos para cada una de ellas, no sólo en muestras frescas sino también en muestras congeladas y enlatadas.

Rincón y col., (2000) obtuvieron perfiles de ADN específicos en tres razas de ganado vacuno, mediante el empleo de cebadores que amplificaban fragmentos comprendidos entre 300 y 2.500 pb.

Sharma y col., (2001) estudiaron la diversidad genética existente en cinco razas de pollo utilizando PCR-RAPD. Con 12 de los 50 cebadores empleados, detectaron diferencias en los polimorfismos de las cinco razas de pollos.

Calvo y col., (2001b) analizaron 30 muestras diferentes de patés mediante la técnica de PCR-RAPD. Emplearon dos cebadores, con los que generaron perfiles de bandas específicos para pato, pollo, pavo y cerdo, pero no consiguieron amplificar banda alguna en las muestras de oca.

Parejo y col., (2002) determinaron la diversidad genética y la estructura poblacional de la raza Blanca Cacereña utilizando RAPD y 71 cebadores.

Stepniak y col., (2002) aplicaron la técnica de PCR-RAPD al estudio de las relaciones evolutivas de cuatro especies de la familia de los cánidos: el zorro ártico, el zorro rojo, el mapache y el perro. Utilizaron 29 cebadores de 10 nucleótidos de longitud.

Bednarczyk y col., (2002) seleccionaron la técnica de PCR-RAPD para evaluar una mezcla que contenía ADN de ocho razas de oca diferentes. El número de bandas amplificadas por cada cebador osciló entre 1 y 8, siendo algunas de las bandas específicas de la raza de oca estudiada.

Finalmente, Saez y col., (2004) generaron diferentes perfiles de bandas de ADN que permitieron la diferenciación de cerdo, vaca, cordero, pollo y pavo en productos cárnicos, utilizando la técnica de PCR-RAPD.

La necesidad de utilizar ADN de cierta calidad para obtener perfiles reproducibles mediante RAPD hace pensar, al menos en principio, en la dificultad de aplicar esta técnica a la identificación de especies en muestras sometidas a tratamientos térmicos, ya que en la mayoría de ellas el ADN se encuentra bastante degradado (Unselde y col., 1995; Martínez y Malmheden Yman, 1998).

Otra limitación de la técnica de RAPD, debida en este caso a la inespecificidad de la propia reacción de amplificación, es la identificación del origen animal de un producto en muestras en las que hay mezclas de dos o más especies, como en los productos tipo paté (Martínez y Daníelsdóttir, 2000).

II.3.7. PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL

Actualmente las técnicas de PCR que se desarrollan en varios pasos, desde la amplificación del material genético al análisis de los productos resultantes, están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un solo tubo. Estos avances en el PCR se basan en la utilización de compuestos fluorescentes y presentan numerosas ventajas en el análisis rutinario de los alimentos. Por ejemplo, el tiempo necesario para obtener resultados se reduce al no requerir el análisis electroforético posterior de los productos de PCR. Además, al realizarse todo el proceso en el mismo tubo se minimizan las posibilidades de contaminación con ADN exógeno y se facilita la automatización. Por otra parte, el equipo proporciona en tiempo real, según transcurre la reacción de PCR, un resultado no cualitativo, sino numérico, que permite la cuantificación y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

II.3.7.1. SISTEMAS DE PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL: DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN

Los sistemas de PCR en tiempo real se caracterizan por detectar la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de la reacción y no por medir la cantidad de producto de PCR generado tras un número determinado de ciclos. Así, cuanto mayor sea el número de copias inicial de la diana del ácido nucleico antes

se detectará un incremento en la fluorescencia, como consecuencia del acúmulo de productos de PCR. De esta forma es posible realizar la cuantificación de ADN o ARN de una forma más exacta y reproducible.

En los últimos años se han descrito varios tipos de ensayos de PCR en tiempo real, que se pueden dividir en dos grandes grupos: sistemas no específicos y específicos. Los sistemas no específicos detectan la presencia o ausencia de amplicones, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados. En este tipo de ensayos se incluyen, por ejemplo, los que utilizan "agentes intercaladores fluorescentes" de la doble cadena de ADN. Su principal inconveniente deriva de la posibilidad de producir falsos positivos si aparecen productos de PCR inespecíficos o dímeros de cebadores. Este inconveniente se evita con los sistemas específicos, en los que se emplean diversos tipos de sondas fluorescentes (Taqman®, "*molecular beacons*" y "*scorpions*") que hibridan específicamente en la secuencia del ADN diana.

Debido a la interdependencia de todos los componentes empleados en un sistema de PCR en tiempo real y con el fin de conseguir resultados reproducibles en los distintos tipos de ensayos, es necesario seguir una serie de pautas para el diseño y optimización de estos sistemas:

- Empleo de un programa informático adecuado para el diseño de los cebadores y de la sonda.
- Selección del tipo de molécula marcadora para el ensayo.
- Establecimiento de los parámetros del termociclador.
- Optimización de la concentración de cebadores y de sonda.

II.3.7.1.1. Empleo de un programa informático adecuado para el diseño de los cebadores y de la sonda

Existen en el mercado diversos programas informáticos para diseñar los cebadores y sondas que intervienen en el ensayo. Los más conocidos son el "Primer Express®, versión 2,0" (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA, EEUU), y el "PCR primer design" (InVitroGen Life Technology, Carlsbad, California, EEUU). Estos programas establecen una serie de parámetros para la correcta

selección de los cebadores y de la sonda (*Tabla 8*). A continuación se describen algunos de los factores más importantes que deben considerarse.

Conviene seleccionar un fragmento (amplicón) con un tamaño comprendido entre 50 y 150 pb (que en ningún caso debería superar los 400 pb), ya que los amplicones pequeños proporcionan una alta eficiencia al ensayo, que se traduce en una mayor exactitud y sensibilidad de la técnica.

Cuando sea posible, para la selección de los cebadores y las sondas debe emplearse una región con un contenido en Guanina/Citosina (G/C) comprendido entre un 30 y un 70%. Regiones con un contenido todavía superior en G/C podrían no desnaturalizarse completamente, provocando una disminución en la eficiencia de la reacción, y requiriendo un aumento de las temperaturas de hibridación o el empleo de disolventes como el glicerol o el dimetilsulfóxido (DMSO). Además, las secuencias ricas en G/C pueden dar lugar a interacciones no específicas que reducen la eficiencia de la reacción y producen señales inespecíficas en los ensayos intercaladores fluorescentes. Asimismo, debe evitarse la utilización de cebadores y sondas que contengan 4 o más guaninas consecutivas. Las secuencias ricas en Adenina/Timina (A/T) requieren cebadores y sondas más largas para obtener la temperatura de fusión o temperatura "*melting*" (T_m) recomendada.

En los ensayos cuantitativos las sondas con más de 40 pb pueden producir resultados insatisfactorios, debido a que se dificulta la transferencia de energía entre el "*reporter*" y el "*quencher*".

El programa informático selecciona los cebadores para que tengan una T_m comprendida entre 58 y 60°C, y la sonda para que presente una T_m 8-10°C superior a la de los cebadores, para asegurar su correcta hibridación durante la fase de extensión. El empleo de cebadores y sondas con una T_m adecuada es uno de los factores que permite el uso de las condiciones universales en el termociclador.

Tabla 8. Normas para la selección de cebadores y sondas para análisis de PCR cuantitativo, empleando como ejemplo el software de Primer Express®		
Parámetros	Cebadores directo (D) e inverso (I)	Sonda (S) para cuantificar
Contenido G/C	30-70%	30-70%
T_m (idéntico para los 2 cebadores)	58-60°C (siempre superior a 55°C por la UNG)	68-70°C (5-10°C superior a la T_m del cebador)
Cadena de nucleótidos consecutivos iguales	Máx. 3 (No deben ser Guaninas)	Máx. 3 (No Guaninas)
Longitud del amplicón (cuanto más corto mejor)	50-150 pb	50-150 pb
Longitud de la secuencia	Mínimo 18 bases	Máx. 40 bases
Distancia D a S	Máx. 50 bases	Máx. 50 bases
Inestabilidad 3' (sólo para cebadores)	Máx. 2 (Gs/Cs) en las 5 últimas bases del extremo 3'	
"quencher" (sólo sonda)		No G en el 5'
Regla G/C (sólo en sonda)		Sonda con más Cs que Gs (seleccionar la otra hebra si es necesario)
Sonda para discriminación alélica		
T_m		65-67°C (7°C más que la T_m del cebador)
Localización de bases polimórficas		En el tercio medio de la secuencia de la sonda

No se deben utilizar sondas que presenten una G en el extremo 5', ya que provoca una reducción de la fluorescencia que perjudica el desarrollo del ensayo. La presencia de guaninas en posiciones cercanas al extremo 5', pero no situadas justo en el extremo, no parece interferir en el ensayo.

Empíricamente también se ha comprobado que las sondas con mayor contenido en citosinas que guaninas producen habitualmente mayor fluorescencia. Si la sonda elegida contiene más G que C, debe seleccionarse la hebra complementaria, asegurándonos de la ausencia de G en el extremo 5'. Por lo que se refiere al extremo 3' de los cebadores, no es aconsejable que contengan más de 2 guaninas o citosinas entre las últimas 5 bases, de esta forma se evita la formación de productos no específicos.

II.3.7.1.2. Selección del tipo de molécula marcadora para el ensayo de PCR cuantitativo

En los ensayos de PCR cuantitativo en tiempo real se pueden emplear distintos tipos de moléculas marcadas con fluorescencia.

PCR cuantitativo con intercaladores fluorescentes

Consiste en el empleo de pequeñas moléculas fluorescentes que se unen al ADN de doble cadena. Existen dos alternativas: los intercaladores como el bromuro de etidio (sustancia fluorescente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del ADN, posibilitando su detección cuando se ilumina con luz ultravioleta) y las moléculas que se unen al surco menor del ADN. Higuchi y col., (1992, 1993) emplearon bromuro de etidio como intercalador utilizando un termociclador adaptado que irradiaba las muestras con luz ultravioleta y detectaba la fluorescencia resultante con un ordenador. La amplificación producida en cada ciclo de la PCR se traduce en un incremento en la cantidad de ADN de doble cadena que se une al bromuro de etidio, provocando un aumento de la fluorescencia. Mediante la relación entre el incremento en la fluorescencia y el número de ciclo, el sistema produce unos patrones de amplificación que nos proporcionan una información más completa del proceso de PCR que un ensayo a tiempo final, donde se valora la acumulación de producto tras un número fijado de ciclos.

Otra opción es la empleada por Scarle y Embrey (1990) que trabajaron con una molécula (Hoeschst 33.258) que se une al surco menor del ADN y cuya fluorescencia aumenta a medida que se une a la doble cadena del ADN.

Para emplear una molécula fluorescente que se una al ADN en la detección de la PCR en tiempo real se requieren dos premisas:

- a.- Que se produzca un incremento en la fluorescencia a medida que la molécula se una a la doble cadena de ADN.
- b.- Que dicha molécula no inhiba la PCR.

SYBR® Green (Applied Biosystems) es una molécula que se une al surco menor del ADN pero no al ADN de cadena sencilla, y que proporciona mayor sensibilidad que el bromuro de etidio. Se trata de un agente intercalador fluorescente, no específico de secuencia (*Figura 11*) que permite cuantificar la producción de amplicón generado.

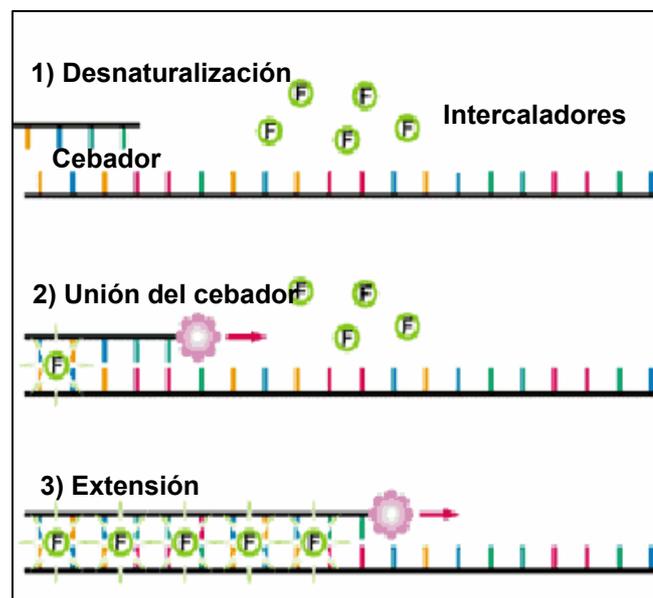


Figura 11. Esquema del mecanismo de acción de las moléculas de SYBR® Green.

La ventaja de emplear como marcador este tipo de moléculas es que se puede incluir junto a los demás reactivos de la PCR y detectar cualquier producto amplificado, independientemente de su secuencia. El inconveniente es que tanto

los productos específicos como los no específicos generan señal. De esta manera cuando un cebador se une a una secuencia no diana se generará un falso positivo como consecuencia de la unión del marcador a los productos generados. Algo similar ocurrirá si se producen dímeros de cebadores durante la reacción de amplificación.

Por otra parte, la utilización de intercaladores como SYBR® Green no permite detectar simultáneamente varias reacciones de amplificación distintas en el mismo tubo.

PCR cuantitativo con sondas Taqman®

La sonda Taqman® es un oligonucleótido que contiene fluorocromos en los dos extremos y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de PCR. El fluorocromo situado en el extremo 5' se llama "*reporter*" y el del extremo 3' recibe el nombre de "*quencher*". Cuando la sonda, que se incluye en la reacción de PCR conjuntamente con los cebadores está íntegra, la proximidad del "*reporter*" y del "*quencher*" provoca un fenómeno denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente) que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda (Didenko, 2001). En el curso de la PCR, la sonda se une a su secuencia diana cuando esta se encuentra presente en la reacción. Durante la extensión de la cadena, la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa, que permite eliminar nucleótidos específicamente desde el extremo 5' de una cadena de ácido nucleico, provoca la liberación del "*reporter*" del extremo 5' de la sonda, que al separarse del "*quencher*" comienza a emitir fluorescencia (*Figura 12*).

La acumulación de los productos de PCR se detecta monitorizando el aumento de fluorescencia por la liberación del "*reporter*". El proceso de hibridación y corte no interfiere con la acumulación exponencial del producto. A medida que aumenta el número de copias del producto, aumenta el de moléculas de sonda que hibridan en su secuencia diana y cada "*reporter*" se separa de su respectiva sonda, por lo que la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de amplicón generado. Como la sonda sólo se corta si hibrida en la secuencia diana, la fluorescencia generada procede exclusivamente de la amplificación específica de productos de PCR.

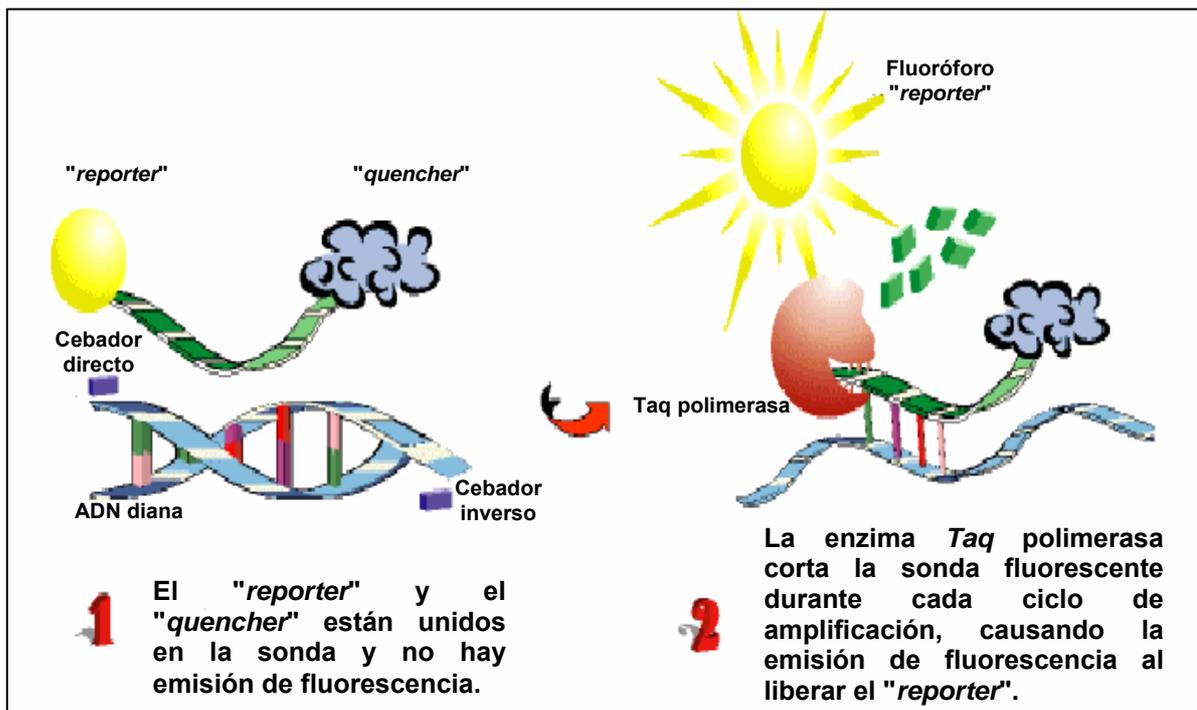


Figura 12. Esquema del mecanismo de acción de las sondas Taqman®.

La ventaja de las sondas Taqman® sobre SYBR® Green es que la hibridación específica entre la secuencia diana y la sonda es la que genera la señal de fluorescencia. Con el empleo de las sondas fluorescentes, la amplificación de productos no específicos por la unión de los cebadores a secuencias no diana, o por la producción de dímeros de cebadores, no genera señal. Además, estas sondas pueden marcarse con diferentes fluorocromos "reporter" en el extremo 5', que se distinguen entre sí porque difieren en sus longitudes de onda de emisión máxima.

El empleo simultáneo de sondas marcadas con diferentes "reporters" permite detectar la amplificación de dos o más secuencias diferentes en una misma reacción de PCR, pero puede provocar algún error a la hora de determinar la contribución de cada fluorocromo en la reacción. El error es mayor cuanto más se superpone la resolución espectral de los fluorocromos. Así, para una cuantificación exacta usando dos sondas marcadas en un mismo tubo hay que usar los fluorocromos que tienen mayor diferencia en la emisión máxima: 6-FAM™ y JOE™ o VIC™. Los fluorocromos más comunes son: 6-FAM™ (6-carboxy-fluorescein), VIC™, TET™ (6-carboxy-tetrachloro-fluorescein), JOE™ (2,7-dimethoxy-4,5-dichloro,6-carboxy-fluorescein) y HEX™ (hexachloro-6-carboxy-fluorescein). En el

extremo 3', se suele utilizar TAMRATM (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) como "quencher". Como referencia interna de las reacciones se emplea ROXTM (6-carboxy-X-rhodamine) que sirve para normalizar las reacciones, evitando fluctuaciones en la fluorescencia de los pocillos por errores en el pipeteo o evaporación de las muestras. La señal generada por la referencia interna no depende de la cantidad de producto de PCR generado. El inconveniente de este sistema radica en que deben sintetizarse diferentes sondas para detectar distintas secuencias.

Sondas Taqman® de próxima generación

Las sondas Taqman MGB de nueva generación presentan dos innovaciones:

- 1) Incorporan una molécula llamada MGB (*minor groove binder*) que se une al surco menor del ADN, incrementando la estabilidad y especificidad de la hibridación de la sonda.
- 2) Emplean un "quencher" no fluorescente (NFQ) en lugar del TAMRATM.

El MGB es una molécula pequeña, con forma de media luna, que encaja en el surco menor del ADN de doble cadena. En las sondas Taqman®-MGB, el grupo MGB va unido al extremo 3', junto al "quencher". Cuando la sonda hibrida, la molécula MGB estabiliza la unión pegándose al surco menor de la doble cadena de ADN generada entre la sonda y la secuencia diana. Esta característica ha permitido el diseño de sondas de menor tamaño, con una longitud comprendida entre 13 y 20 pb, la mitad que una sonda estándar.

Por otra parte, las sondas Taqman® MGB usan un "quencher" no fluorescente, también conocido como "quencher oscuro". Este "quencher" no fluorescente es una molécula que actúa como un aceptor de transferencia energética de un "reporter", pero que no emite señal fluorescente detectable por sí misma. La ventaja es que se emite una señal más limpia y con menos fondo fluorescente procedente de la reacción, mejorando la discriminación y facilitando la interpretación de los datos. El NFQ proporciona buenos resultados cuando se emplea con cualquiera de los "reporter" más comunes (FAMTM, VICTM, TETTM).

Las principales ventajas de las sondas MGB cuando se emplean en PCR cuantitativo en tiempo real, se deben a su mayor especificidad de hibridación, que

permite una mayor discriminación, y a su pequeño tamaño, que facilita el diseño de ensayos y la reducción del tamaño del amplicón, lo que mejora la fiabilidad del ensayo.

Otros métodos fluorescentes

Existen otros métodos que también emplean fluorescencia y que se pueden usar para monitorizar la detección de productos de PCR específicos en tiempo real.

A) "Cebadores fluorescentes"

En este sistema, uno de los cebadores incorpora una extensión en forma de horquilla en el extremo 5'. La emisión de fluorescencia del "reporter" del extremo 5' está impedida por la proximidad de una molécula "quencher", que previene la producción de la señal. Cuando el cebador se une a su secuencia diana y comienza la extensión de la cadena, la hebra complementaria de ADN que se está sintetizando provoca la apertura de la horquilla y la subsiguiente emisión de fluorescencia (Figura 13).

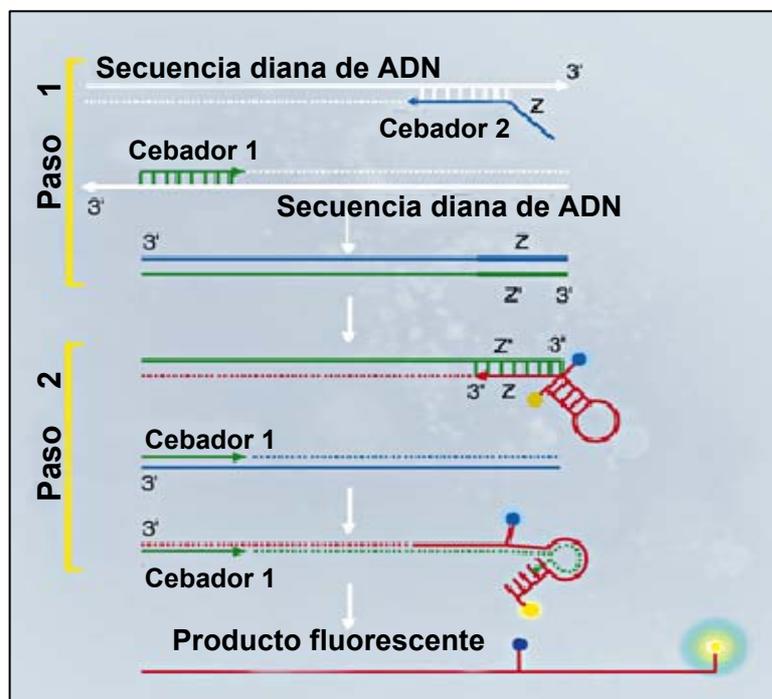


Figura 13. Esquema del mecanismo de acción de los cebadores fluorescentes.

Esta técnica detecta la presencia o ausencia de productos de amplificación, pero no proporciona información acerca de la naturaleza de esos productos. La presencia de amplicones no deseables o la aparición de dímeros de cebadores podría dar lugar a falsos positivos.

B) "Cebadores Scorpion™"

Son oligonucleótidos compuestos por un cebador con una región funcional y una extensión en forma de horquilla en el extremo 5'. El bucle de la extensión híbrida con la secuencia diana, el extremo 5' está marcado con un fluorocromo y el 3' contiene un "quencher" en el punto donde se une a la zona funcional del cebador. La proximidad del "reporter" y el "quencher" en estado libre previene la emisión de fluorescencia (Figura 14). Un monómero situado entre el cebador y la horquilla impide que la extensión pueda copiarse mientras se forman nuevos productos de PCR. Cuando la secuencia diana se encuentra en la solución, el cebador se une a ella para extender el producto de PCR recién formado, que contiene la secuencia complementaria a la sonda. La sonda se despliega entonces para unirse a esta secuencia, separando el fluorocromo y el "quencher" y detectándose la fluorescencia.

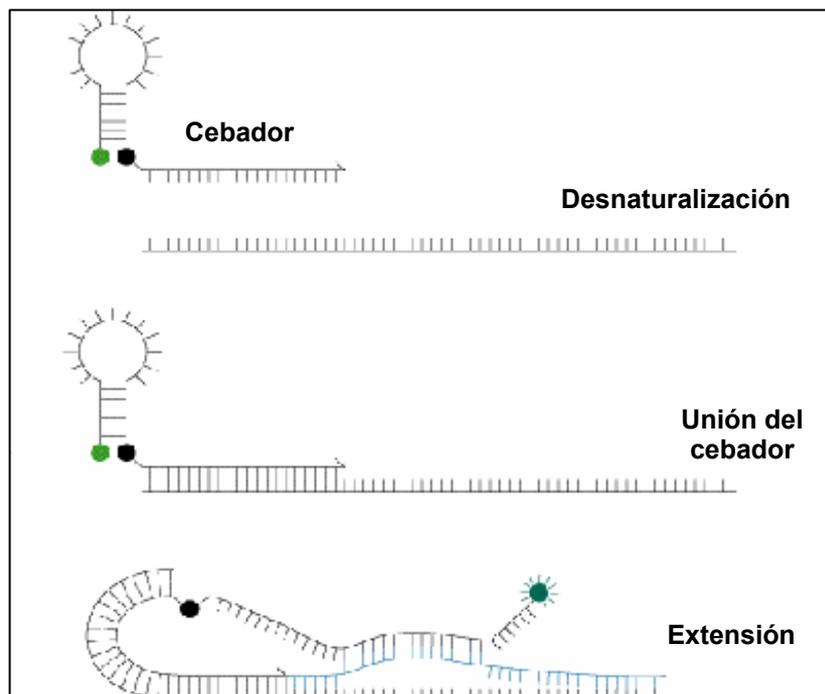


Figura 14. Esquema del mecanismo de acción de los cebadores Scorpion™.

C) "Moléculas fluorescentes" (*Molecular Beacons*)

Son oligonucleótidos de cadena sencilla diseñados para hibridar en amplicones específicos, que incorporan una extensión en cada extremo cuyas secuencias son complementarias, por lo que adopta la conformación de horquilla.

Presentan un "quencher", denominado DABCYL, en un extremo del brazo de la horquilla y un fluorocromo en el otro extremo. El "quencher" es una molécula no fluorescente que disipa en forma de calor la energía que recibe del fluorocromo. En solución, estas moléculas fluorescentes adoptan forma de horquilla manteniendo muy próximos el fluorocromo y el "quencher", impidiendo la emisión de fluorescencia. Cuando la molécula encuentra una secuencia diana se despliega para hibridar con la misma, separándose el fluorocromo del "quencher" y detectándose la fluorescencia (*Figura 15*). Si la secuencia diana de ADN no encaja perfectamente con la secuencia de la sonda, no se producirá hibridación y no habrá fluorescencia, ya que si las secuencias no se unen perfectamente el plegamiento de estas moléculas en forma de horquilla predomina sobre la hibridación. Al igual que las sondas Taqman® también pueden estar marcadas con diferentes fluorocromos en el extremo 5' (FAM™, TET™, TAMRA™, ROX™) lo que permite detectar varias secuencias diana en el mismo tubo. La especificidad del sistema permite detectar diferencias de un solo nucleótido (Marras y col., 1999).

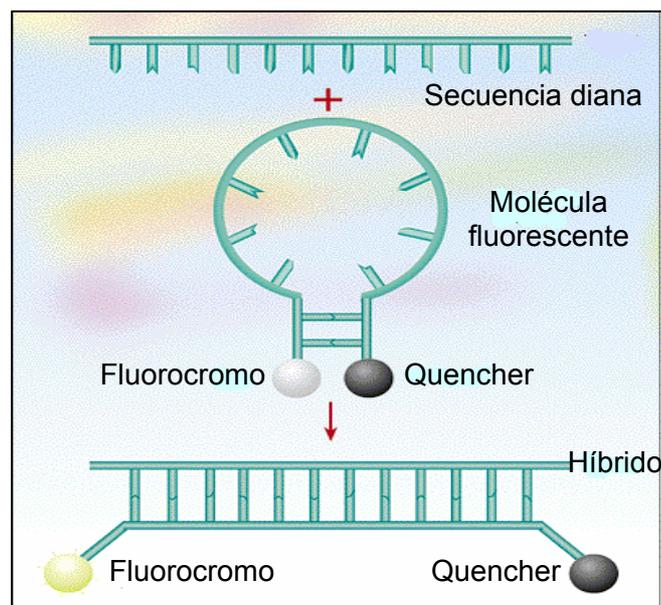


Figura 15. Esquema del mecanismo de acción de las moléculas fluorescentes.

D) "Sondas Lightcycler™"

Se emplean dos sondas que hibridan en posiciones adyacentes de la secuencia diana y están marcadas con diferentes fluorocromos en extremos opuestos. Una de las sondas lleva en el extremo 3' un emisor fluorescente que emite una luz verde cuando es excitado por una fuente de luz. La otra sonda presenta en el extremo 5' un fluorocromo aceptor y debe tener bloqueado el extremo 3' para impedir la extensión durante su hibridación. En solución, las sondas están separadas y no se produce fluorescencia, pero cuando se presenta la secuencia diana las dos sondas se unen cabeza con cola en dicha secuencia permitiendo a los fluorocromos estar en contacto. La excitación de la molécula donante provoca la transferencia de energía a la molécula aceptora, la cual emite luz a diferente longitud de onda para producir una señal fácilmente detectable y proporcional a la cantidad de ADN específico sintetizado durante la reacción de PCR (Figura 16).

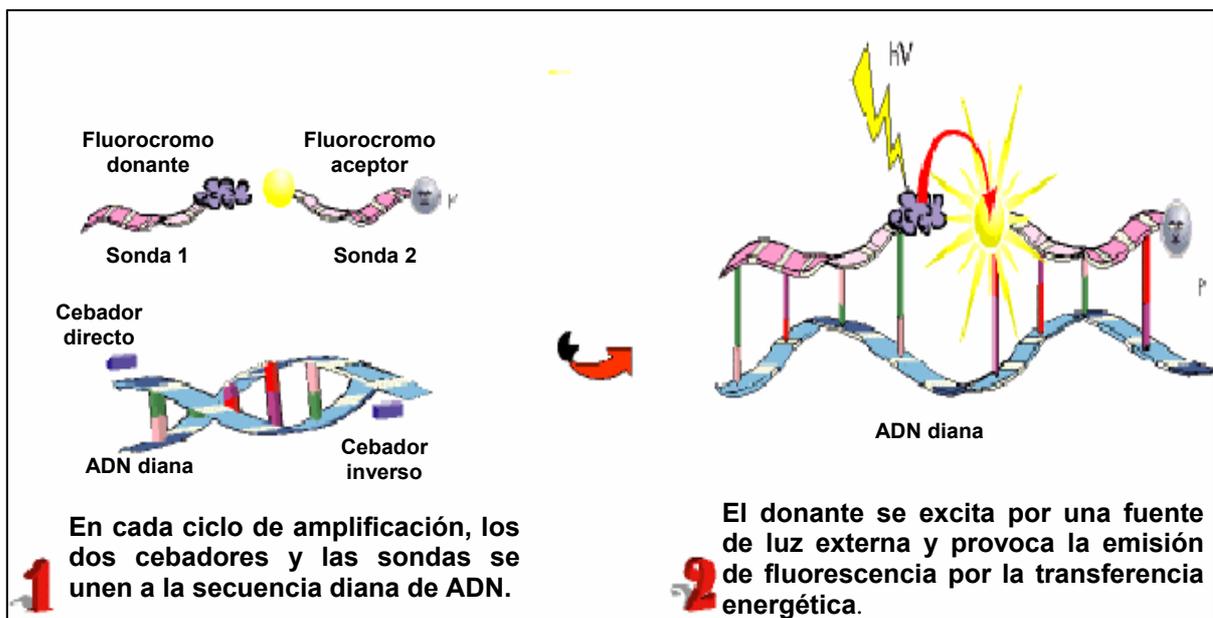


Figura 16. Esquema del mecanismo de acción de las sondas Lightcycler™.

II.3.7.1.3. Establecimiento de los parámetros empleados en el termociclador

Los dos sistemas más utilizados para la realización de ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real con ADN o ADNc como sustratos, son los que emplean sondas Taqman® o SYBR® Green. En ambos casos, es frecuente utilizar de forma

rutinaria los siguientes ciclos de tiempo/temperatura para llevar a cabo la amplificación:

50°C 2 min.
 95°C 10 min.
 95°C 15 s. }
 60°C 1 min. } **40 Ciclos**

La incubación previa durante 2 minutos a 50°C es necesaria cuando se utiliza la actividad *AmpErase*® UNG. La incorporación conjunta de la enzima *AmpErase*® Uracil N-glicosilasa (UNG) y dUTP tiene por objetivo proteger los experimentos de contaminaciones previas por fuentes no controladas de ADN.

Por otra parte, el calentamiento inicial durante 10 minutos a 95°C se debe a la utilización del sistema de inicio en caliente (*hot start*) con el fin de reducir la formación de productos no específicos. La enzima *AmpliTaQ Gold*® ADN polimerasa es una de las más empleadas en los ensayos de PCR cuantitativo y está diseñada para permanecer inactiva hasta que se calienta a 95°C durante 10 minutos, por lo que no es necesario conservarla en hielo.

Aunque la reacción de PCR consta habitualmente de 3 etapas (desnaturalización de la doble cadena de ADN, unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas de ADN y extensión de la cadena de ADN a partir de los cebadores mediante la incorporación de los nucleótidos presentes en la solución), en la técnica de PCR cuantitativo sólo se emplean dos, debido al pequeño tamaño de los fragmentos generados. No es necesario añadir una tercera etapa a 72°C para extender la cadena de ADN, ya que el tiempo invertido en pasar entre las fases de unión de los cebadores a 60°C y de desnaturalización a 95°C es suficiente para copiar la secuencia diana.

II.3.7.1.4. Optimización de la concentración de cebadores y sonda

Variando las concentraciones de los cebadores y las de la sonda se pueden identificar aquellas que permiten las condiciones óptimas para el desarrollo del ensayo. Los cebadores se encuentran en exceso durante la fase exponencial de la amplificación por PCR, por lo que conviene ajustar su concentración inicial para

mejorar su efectividad. Variando las concentraciones entre 50 nM y 900 nM (*Tabla 9*) se pueden optimizar los cebadores para evitar uniones no específicas que podrían reducir la cantidad de cebador disponible para unirse al sitio específico. De igual forma este ajuste permite compensar pequeños errores de T_m estimados por el programa informático durante su diseño. La concentración óptima del ensayo es aquella que proporciona el C_t (fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la línea umbral) menor y la fluorescencia mayor para una cantidad prefijada de secuencia diana. Aunque la cuantificación se realiza según el C_t obtenido, el incremento de la fluorescencia (ΔR_n), también es un valor importante cuando se trata de conseguir una alta sensibilidad y reproducibilidad en el ensayo.

Si se emplea una concentración de sonda de 250 nM (sonda en exceso) se asegura una fluorescencia elevada, pero conviene optimizar la sonda en los ensayos por el elevado coste de la misma. Variando concentraciones de sonda entre 50-250 nM se puede determinar la más idónea para cada ensayo, que será aquella que proporcione el C_t más bajo y una fluorescencia alta.

Tabla 9. Matriz de optimización de los cebadores			
Cebador Inverso (nM)	Cebador directo (nM)		
	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

II.3.7.2. CUANTIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL

La posibilidad de monitorizar en tiempo real el progreso de la reacción de PCR ha revolucionado las técnicas de cuantificación del ADN y del ARN. Los sistemas en tiempo real se caracterizan por detectar la amplificación de un producto de PCR

durante el desarrollo de la misma y no por medir la cantidad de producto de PCR generado tras un número determinado de ciclos. Así, cuanto mayor sea el número inicial de copias del ácido nucleico diana antes se detectará un incremento en la fluorescencia como consecuencia del acúmulo de productos de PCR. La *Figura 17* muestra un diagrama donde aparecen los términos que habitualmente se emplean en el análisis cuantitativo.

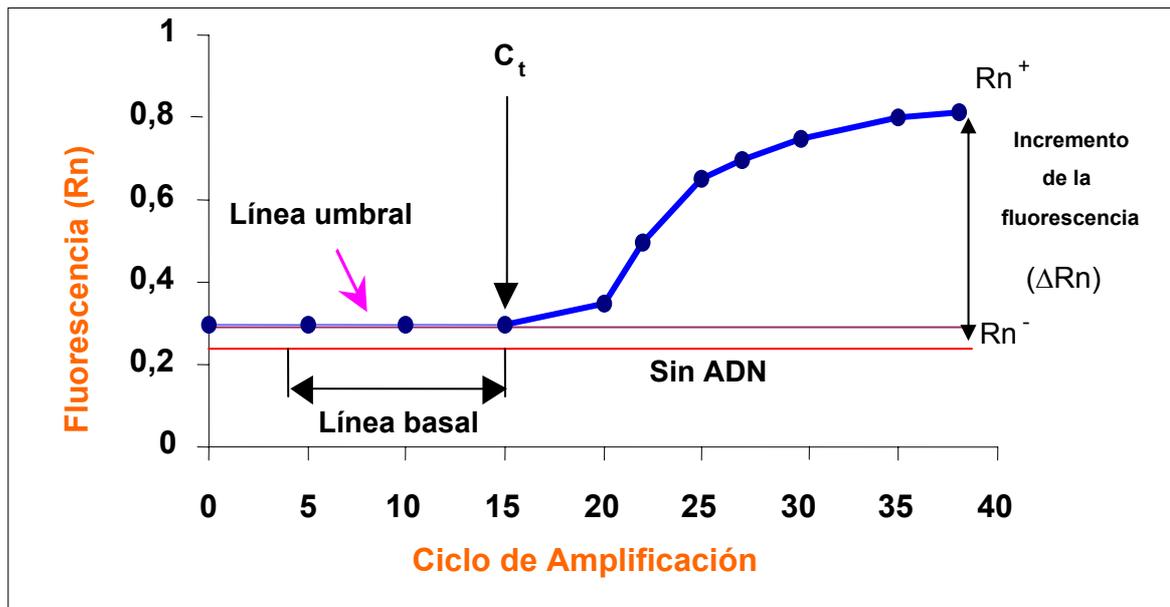


Figura 17. Modelo de amplificación donde se muestran los términos comúnmente usados en el PCR cuantitativo en tiempo real.

Un gráfico de amplificación relaciona la señal de fluorescencia (ΔR_n) frente al número de ciclo (*Figura 18A*).

En los ciclos iniciales de la PCR, apenas hay cambios en la señal de fluorescencia. Esta zona define la línea basal del gráfico de amplificación. La línea umbral indica el nivel de fluorescencia a partir del cual se comienza a detectar producto de PCR acumulado. Esta línea debe situarse por encima de la línea basal y dentro de la zona en la que se produce la fase exponencial de la reacción (que es lineal en la transformación logarítmica del gráfico). El parámetro C_t (ciclo umbral o *threshold cycle*) se define como la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la línea umbral. En los ensayos de PCR cuantitativo se emplea el C_t , y no la cantidad de producto de PCR acumulado al final de la amplificación, como medida fiable del número de copias inicial de ADN diana. Esto se debe a que el

valor del C_t , que se registra en cada ciclo de la PCR, se obtiene cuando la reacción está en la fase exponencial y ningún componente de la reacción está limitado, por lo que los valores de C_t obtenidos son muy reproducibles en reacciones con el mismo número de copias iniciales. Por el contrario, la cantidad de producto de PCR acumulado al final de la reacción es muy sensible a pequeñas variaciones en los componentes de la reacción, ya que las medidas a tiempo final se realizan normalmente cuando la reacción ya ha superado la fase exponencial y la presencia de algún componente en concentración limitante podría afectar a la cantidad de producto final. Así, por ejemplo, la formación de dímeros de cebadores puede consumir reactivos en algunos tubos, y una muestra con mayor número de copias inicial podría terminar teniendo menor concentración de productos acumulados que otra con menor número de copias inicial en la que no se hubieran producido dímeros.

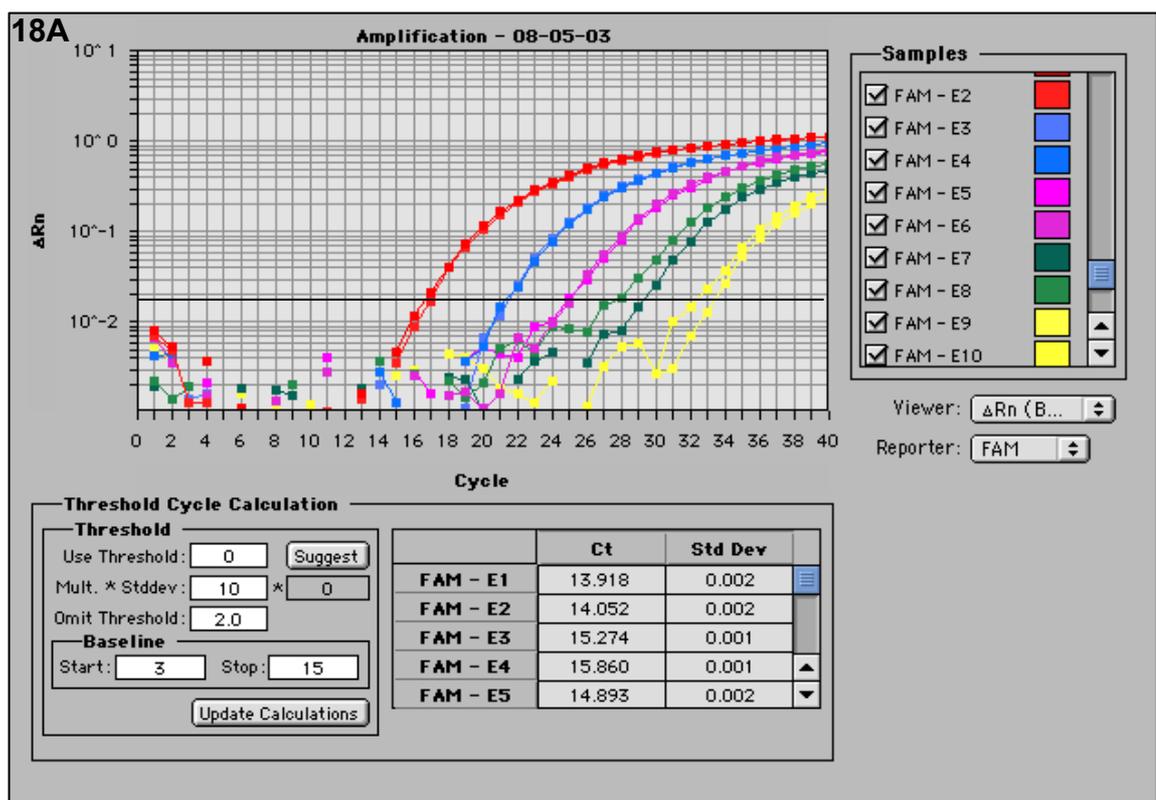


Figura 18A. Gráfico de amplificación donde se representa el incremento de fluorescencia frente al C_t obtenido.

En las muestras problema, la cuantificación se lleva a cabo midiendo el C_t y empleando una recta estándar para determinar el número de copias inicial. La recta estándar viene representada por una gráfica que relaciona el log del número de copias inicial de la secuencia diana frente al C_t y es una línea recta, cuya pendiente refleja la eficiencia de la reacción de amplificación (*Figura 18B*). El cálculo de los C_t , la preparación de la recta estándar y la determinación del número de copias inicial en las muestras problema lo lleva a cabo el programa informático del propio ordenador que controla el equipo en que se realiza la amplificación (*Figura 19*).

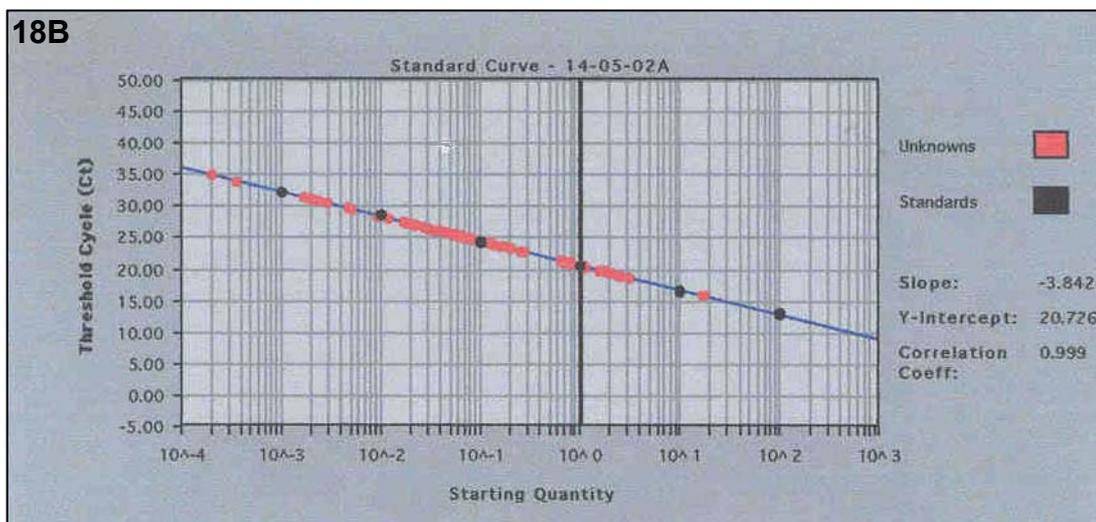


Figura 18B. Recta patrón donde se representa el log del número de copias inicial frente al valor de C_t obtenido.

Las ventajas del PCR cuantitativo en tiempo real frente a los sistemas que miden el producto acumulado a tiempo final son:

- En los ensayos en tiempo real existe relación de linealidad entre el C_t y la cantidad inicial de ADN, en un intervalo que abarca 5 órdenes de magnitud de concentración inicial de ADN, mientras que este intervalo es sólo de uno o dos órdenes de magnitud en los ensayos a tiempo final.
- La técnica de PCR cuantitativo en tiempo real elimina el procesado posterior de los productos de PCR (análisis electroforético, restricción con endonucleasas, etc.) lo que reduce la contaminación y elimina una posible fuente de error.

- Los valores de C_t son menos sensibles a los inhibidores de la PCR que los valores obtenidos a tiempo final, ya que se miden durante la fase exponencial, donde los componentes de la reacción no están limitados.



Figura 19. Equipos empleados en la cuantificación en tiempo real. **19A)** SDS 7700 de Applied Biosystems; **19B)** Sistema *Lightcycler* de Roche; **19C)** Sistema de detección de PCR en tiempo real de Bio-Rad.

II.3.7.3. INSTRUMENTACIÓN

Existen varios equipos diseñados por distintas compañías para monitorizar fluorescencia en tiempo real, a medida que los productos de PCR se acumulan ciclo a ciclo. El sistema más sencillo es el sistema de detección de secuencias (SDS) 5700 (Applied Biosystems). Este sistema consiste en un detector óptico unido a un termociclador modelo 9600 y a un ordenador que incluye un programa informático que permite cuantificar de forma reproducible ácidos nucleicos. Los resultados se obtienen al término de la reacción de PCR sin necesidad de análisis o purificación adicional. El sistema está adaptado para permitir el empleo de sondas Taqman® y de moléculas de SYBR® Green. Los 96 tubos de reacción se

excitan con una fuente de luz y la fluorescencia resultante se detecta por una cámara CCD (*charge-coupled device*) que captura la imagen de los 96 tubos. El ordenador recoge las imágenes generadas en el termociclador en los distintos ciclos de la PCR y el programa informático analiza los datos para generar un mapa de amplificación para cada reacción. El sistema 5700 permite emplear una referencia interna (ROX™) que sirve para normalizar las reacciones y evitar las fluctuaciones de fluorescencia entre los pocillos, aunque su principal limitación es que detecta sólo un color, ya que no puede distinguir entre dos o más fluorocromos.

El SDS 7700 (Applied Biosystems) (*Figura 19A*) es un sistema más flexible diseñado para utilizar sondas fluorogénicas. El sistema 7700 incluye un termociclador de 96 pocillos sobre cada uno de los cuales se dirige un láser mediante cables de fibra óptica. La fluorescencia emitida regresa a través de estos cables hasta una cámara CCD que la detecta. El programa informático del ordenador (SDS 7700 software, versión 1,7) analiza los datos calculando en primer lugar la contribución de cada componente fluorescente al experimento, y luego establece la relación entre la señal emitida por el "reporter" y la fluorescencia de una referencia interna (ROX™) para normalizar las fluctuaciones de fluorescencia ocurridas en cada pocillo. Este equipo detecta un espectro de fluorescencia comprendido entre 500 y 660 nm, lo que le permite distinguir y cuantificar múltiples fluorocromos en cada pocillo de la placa. El empleo de esta referencia interna, así como la capacidad para distinguir varios fluorocromos aumenta la precisión de los datos obtenidos con el sistema 7700. Además, se pueden usar conjuntamente sondas marcadas con diferentes "reporters", cuantificándose más de una diana en el mismo tubo, con el consiguiente ahorro de reactivos. Este aparato permite múltiples aplicaciones que incluyen cuantificación absoluta y relativa y detección de polimorfismos nucleotídicos (discriminación alélica).

Los dos equipos más recientes de Applied Biosystems son el SDS 7900 y el SDS 7000. Estos nuevos sistemas tienden a aumentar el número de muestras que se pueden analizar simultáneamente (el SDS 7900 utiliza una placa de 384 pocillos) o a disminuir el tamaño de los aparatos empleados (el sistema SDS 7000 tiene un tamaño menor para ahorrar espacio).

Existen equipos desarrollados por otras compañías como el sistema *Lightcycler* (Figura 19B) desarrollado por Roche (Mannheim, Alemania) que no emplea tubos o placas sino capilares que son más eficientes en la transferencia térmica, permitiendo unos ciclos en el termociclador más cortos y ahorrando tiempo en la obtención del resultado. El sistema de detección de PCR en tiempo real de Bio-Rad (Figura 19C) (Hercules, CA, EEUU) ofrece la posibilidad de adquirir separadamente el termociclador y el ordenador que analiza los resultados. El sistema Multiplex PCR cuantitativo de Stratagene (La Jolla, CA, EEUU) y el sistema *Smart Cycler* de Cepheid (Sunnyvale, CA, EEUU) son otros equipos presentes en el mercado.

II.3.7.4. APLICACIONES

Las aplicaciones del PCR cuantitativo en tiempo real son múltiples, aunque el análisis cuantitativo de las secuencias de ácidos nucleicos se ha empleado principalmente en investigación biológica. Las aplicaciones en la industria alimentaria se circunscriben a tres sectores: 1) detección y cuantificación de organismos modificados genéticamente, 2) detección y enumeración de microorganismos y 3) determinación de la autenticidad de los alimentos.

La detección de OMG en materias primas, ingredientes o productos procesados tiene una importancia creciente debido al aumento experimentado en su producción y consumo. Las plantas se modifican genéticamente para mejorar la calidad del producto final (en cuanto a su durabilidad, firmeza, maduración o valor nutritivo), para mejorar su resistencia a plagas (insectos, nematodos, virus) o para obtener beneficios agronómicos, como la tolerancia a condiciones climatológicas y edafológicas adversas o a herbicidas. El constante desarrollo de nuevas plantas, microorganismos y animales modificados genéticamente ha generado la necesidad de disponer de métodos de análisis apropiados para detectar, identificar y cuantificar los OMG, con el fin de detectar y evitar posibles riesgos para la salud humana o el medio ambiente que pudieran derivarse de su producción o consumo (Haslberger, 2000).

En el análisis microbiológico de los alimentos, el empleo de métodos rápidos de PCR cuantitativo en tiempo real presenta importantes ventajas frente a los métodos tradicionales de aislamiento e identificación de patógenos, que requieren días o semanas para establecer el diagnóstico. El ensayo de PCR cuantitativo en tiempo

real es más sensible y específico que las técnicas convencionales de detección de patógenos (Desjardin y col., 1998), y se ha empleado para detectar y cuantificar en los alimentos diferentes bacterias, parásitos, hongos y virus (Boyapalle y col., 2001; Gruber y col., 2001; Frederick y col., 2002; Nicolas y col., 2002).

En la identificación de especies, la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real se ha empleado para cuantificar diferentes especies animales en alimentos destinados al consumo humano (Brodmann y Moor, 2003; Rehbein y Horstkotte, 2003; Sawyer y col., 2003; Sotelo y col., 2003; Walker y col., 2003, 2004). Asimismo, también se ha utilizado para detectar y cuantificar ADN bovino en harinas destinadas a la alimentación animal (Lahiff y col., 2002).

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL

III.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

III.1.1.1. MUESTRAS DE FOIE GRAS Y CARNE

En este trabajo se han utilizado como muestras de referencia para el desarrollo de los ensayos, *foie gras* entero procedente de pato mulard (*Anas platyrhynchos* x *Cairina muschata*) y oca (*Anser anser*).

Las muestras de *foie gras* frescas y pasteurizadas se adquirieron en Antonio de Miguel S.A. (Pinto, Madrid) distribuidor de MARTIKO (Bera, Navarra). También se han empleado muestras pasteurizadas de *foie gras* de primera categoría procedentes de la empresa IMPERIA *foie gras* (Gerona), y muestras de *foie gras* esterilizadas adquiridas en mercados *delicatessen* locales. Una vez identificada la especie de procedencia de cada muestra, atendiendo a sus características morfológicas, se prepararon submuestras de aproximadamente 5 g, las cuales se envasaron y conservaron a -85°C para su utilización posterior.

Las muestras procedentes de pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja, cabra, conejo y caballo se adquirieron en diversas carnicerías y charcuterías ubicadas en la Comunidad Autónoma de Madrid.

III.1.1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la producción de los inmunosueros se emplearon 4 lotes de 2 conejos macho de la raza *Nueva Zelanda* de 3-3,5 Kg de peso. Los conejos se mantuvieron en el Centro de Asistencia a la Investigación “Animalario de la Universidad Complutense”, alimentados con dieta de mantenimiento para animales de experimentación y agua potable *ad libitum*.

III.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

Las pesadas ordinarias se efectuaron en una balanza monoplato “AND” mod. EW-600A. Para las pesadas de precisión se utilizó la balanza analítica “AND” mod. ER-120A.

Para la preparación de los tampones y disoluciones acuosas se empleó agua destilada, obtenida en un aparato de filtración “Millipore” mod. Elix 3 y agua bidestilada, obtenida en un destilador “Nanopure” mod. Barnstead. Las mediciones de pH se realizaron con un pHmetro “Methohm” mod. 654.

Los tampones se disolvieron mediante agitación electromagnética y en algunos casos aplicando calor, con placas “Nuova II” mod. Thermolyne. Los agitadores de tubos empleados fueron “Heidolph” mod. REAX 2000.

Las incubaciones que requerían un control preciso de la temperatura se efectuaron en un baño de agua termostatzado “Grant” mod. Y14 y en una estufa “Heraeus” mod. KB-500. Las incubaciones en agitación se llevaron a cabo en un incubador-agitador orbital “Lab-line” mod. 35271.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada “Sorvall” mod. RC-5B, equipada con rotores SS-34 y GSA. Para centrifugar pequeños volúmenes de muestra se utilizaron centrífugas “Heraeus” de los siguientes modelos: Biofuge A, equipada con rotor tipo 1220; Megafuge, 1.0, equipada con rotor tipo 2150 y Biofuge 15R equipada con rotor tipo HFA 3042. En la extracción de proteínas se empleó una ultracentrífuga “Sorvall OTD Combi”.

Las filtraciones de los tampones se realizaron con filtros “Millipore” mod. HATF, de 0,45 μm y mod. GVWP, de 0,22 μm .

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz UV-VIS “Hitachi” mod. U-2000.

Las mezclas cárnicas se homogeneizaron utilizando una picadora “Sunbeam Oster” mod. 4153-50.

Las muestras y reactivos se conservaron en arcones congeladores “Sanyo” mod. MDF-392, y “Heraeus” mod. HFU-686, mantenidos a $-85^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. También se utilizó un congelador “Kelvinator” mod. ACK-55, mantenido a $-20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, así como un frigorífico “Kelvinator” mod. AKR-20 y un armario frigorífico “Kelvinator”, mantenidos a $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para la extracción de ADN con el kit *Wizard[®] DNA Clean-up* se empleó una bomba de succión de “Fisher Scientific” mod. EYELA A-3S y un aparato de vacío con

capacidad para 20 muestras, de "Promega" (*Vac-Man[®] Laboratory Vacuum Manifold*).

Para la amplificación de los fragmentos génicos de interés, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó un termociclador "Techne" mod. Progene, equipado con tapa calefactora.

Las electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa se realizaron en cubetas de electroforesis horizontales para ácidos nucleicos "Gibco BRL" mod. HORIZON 58 y "Bio-Rad" mod. Sub-Cell GT. Se emplearon fuentes de alimentación "Gibco BRL" mod. 250 Power Supply y "Bio-Rad" mod. Power Pac 300.

La visualización de los fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando un transiluminador de luz ultravioleta "Espectroline" mod. TL-312A y un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a un sistema de documentación de imágenes "BioRad" mod. Geldoc 1000 UV.

Todas las manipulaciones de material genético se efectuaron en una campana de flujo laminar "Telstar" mod. AV-100, equipada con lámpara de luz ultravioleta.

Para las técnicas de PCR cuantitativo en tiempo real se empleó el Sistema de Detección de Secuencias 7700 de Applied Biosystems, equipado con placas ópticas de 96 pocillos cubiertas de tapas adhesivas de Applied Biosystems.

Se emplearon micropipetas automáticas "Labsystems" mod. Finnpipette de 0,5-10 μL , de 5-40 μL , de 40-200 μL , de 200-1.000 μL y de 1-5 mL. También se utilizaron pipetas multicanal "Labsystems" mod. Finnpipette de 40-200 μL y una pipeta eléctrica "Biohit" mod. Proline[®] Midi.

Como material general de laboratorio se utilizaron tubos de microcentrífuga tipo eppendorf, viales estériles, pipetas pasteur, vasos de precipitados, matraces erlenmeyer, matraces aforados, agitadores, mecheros de gas, termómetros, jeringuillas, hojas de bisturí, etc. El material de vidrio empleado fue siempre de tipo "Pyrex".

La esterilización del material utilizado en este trabajo se realizó en un autoclave "Selecta" mod. Autester G, utilizando cintas de papel indicador para comprobar la

efectividad del proceso. La esterilización de material de vidrio se realizó por calor seco en una estufa de aire forzado “Heraeus” mod. KFTU-K.

III.1.3. PRODUCTOS Y REACTIVOS

Los productos químicos y biológicos utilizados en los experimentos descritos en este trabajo fueron suministrados por los siguientes laboratorios: “Amersham Biosciences” (Piscataway, NJ, EEUU), “Appligene-Oncor” (Heidelberg, Alemania), “Bio 101 Inc” (La Jolla, California, EEUU), “BioRad” (Hercules, EEUU), “Biotools” (Madrid, España), “BioVentures” (Tennessee, EEUU), “Dako” (Glostrup, Dinamarca), “Difco” (Michigan, EEUU), “Ecogen” (Barcelona, España), “Fluka” (Buchs, Suiza), “Gibco BRL” (Maryland, EEUU), “Isogen” (Utrecht, Holanda), “Merck” (Darmstadt, Alemania), “New England Biolabs” (Beverly, EEUU), “Nunc” (Wiesbaden, Alemania), “Panreac” (Barcelona, España), “Perkin Elmer-Applied Biosystems Division” (California, EEUU), “Promega” (Wisconsin, EEUU), “Pronadisa” (Torrejón, España), “Qiagen GmbH” (Hilden, Alemania), “Roche” (Basilea, Suiza), y “Sigma” (St. Louis, EEUU).

En las técnicas genéticas se emplearon reactivos con calidad “para biología molecular” y en las técnicas inmunológicas se utilizaron reactivos con calidad “para análisis”.

III.2. METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL DESARROLLO DE LAS TÉCNICAS GENÉTICAS

En la *Figura 20* se muestra un esquema de la metodología desarrollada en este trabajo para la identificación de oca, pato, pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra. A continuación, se describe detalladamente cada uno de los métodos empleados.

III.2.1. SELECCIÓN DE MARCADORES GÉNICOS

La selección de marcadores adecuados constituyó el primer paso para llevar a cabo la identificación genética de oca y pato, así como de otras especies que pueden incorporarse fraudulentamente al *foie gras*.

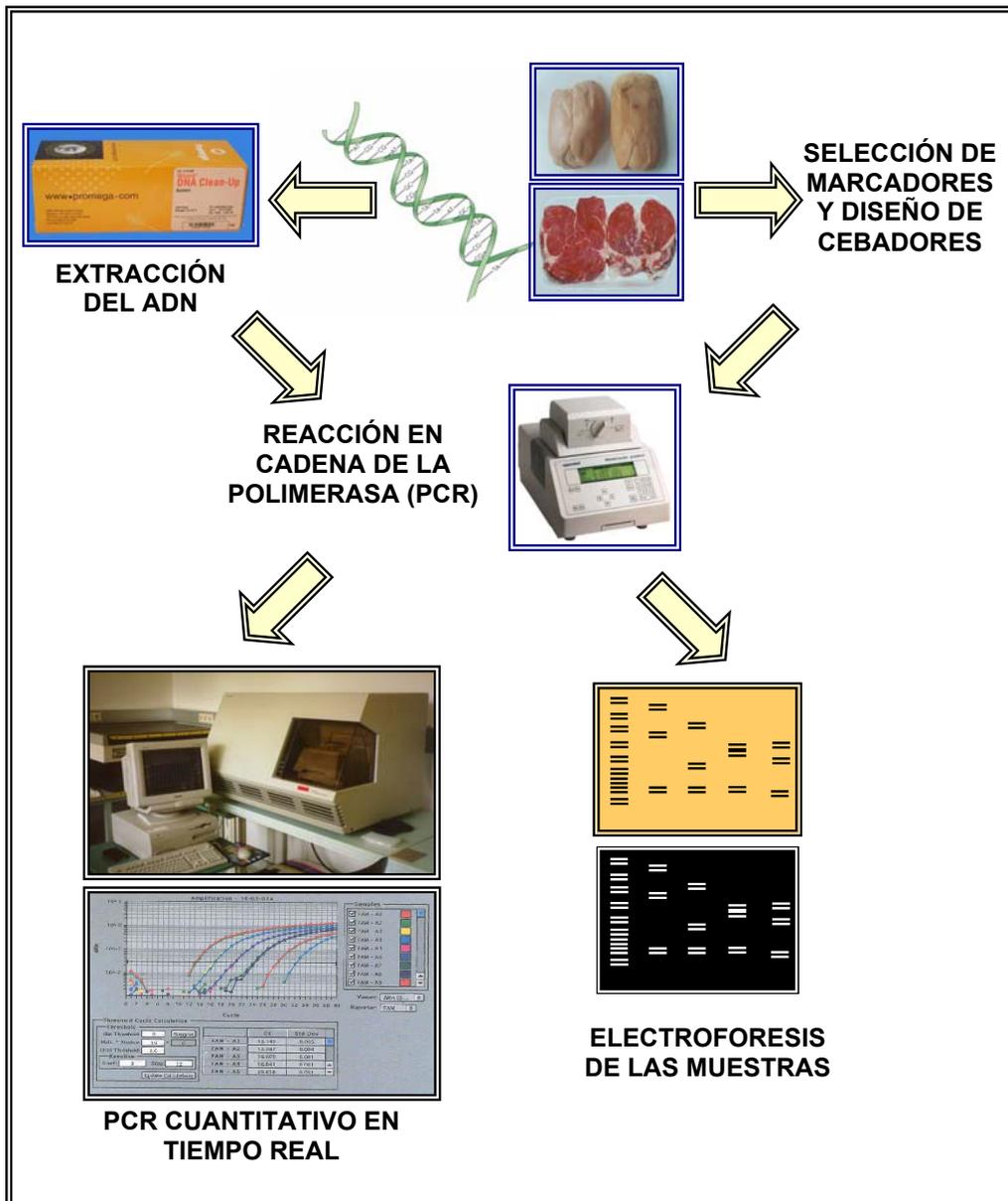


Figura 20. Esquema de la metodología seguida en este trabajo para la identificación genética de oca, pato mulard, pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra.

Para la selección de marcadores génicos se realizó una búsqueda bibliográfica de secuencias de genes de las especies de interés. Se seleccionaron genes con regiones conservadas que permitieran amplificar el mismo fragmento de ADN en las especies seleccionadas, pero a la vez con un grado de mutación suficiente para poder encontrar diferencias en las secuencias que facilitaran la diferenciación.

Se eligieron dos genes nucleares, el gen que codifica la subunidad 5S del ARNr (*gen 5S ADNr*) y el gen que codifica la proteína α -actina. Como gen mitocondrial se utilizó el gen que codifica la subunidad 12S del ARNr (*gen 12S ARNr*).

III.2.2. SELECCIÓN Y DISEÑO DE CEBADORES

Una vez elegidos los marcadores génicos, se procedió a la selección y al diseño de cebadores que permitieran la amplificación de cada uno de ellos.

Para el diseño de los cebadores se utilizó el programa PRIMER EXPRESS® versión 2,0 (Applied Biosystems). Las secuencias de los cebadores diseñados se compararon, mediante el programa FASTA del paquete informático *Genetic Computer Group* (GCG), con todas las secuencias de las bases de datos *GenBank* y *EMBL* con el fin de comprobar su concordancia con las secuencias disponibles en otras especies.

Las casas comerciales AMERSHAM BIOSCIENCES y SIGMA sintetizaron todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo.

III.2.2.1. CEBADORES DEL GEN NUCLEAR 5S ADNr

En los organismos eucariotas superiores, el gen 5S ADNr consta de una zona codificante de 120 pb (*gen 5S ARNr*), cuya secuencia está muy conservada en todas las especies, y de un fragmento espaciador no codificante (NTS) de longitud variable. Esta unidad básica (5S ARNr + NTS) se repite en el cromosoma un número variable de veces dependiendo de la especie (*Figura 21*).

Para la amplificación del gen nuclear 5S ADNr se utilizaron cinco cebadores distintos (*Tabla 10*):

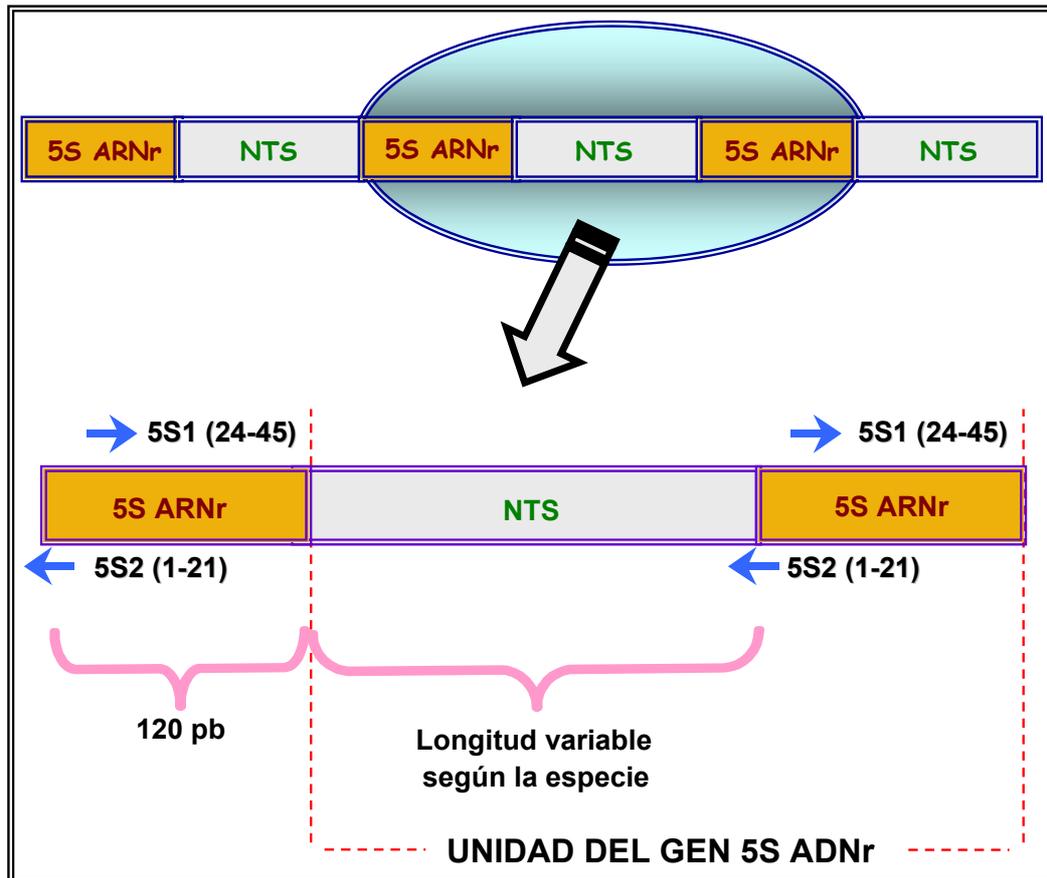


Figura 21. Estructura básica del gen 5S ADNr en eucariotas.

Tabla 10. Cebadores empleados para amplificar el gen nuclear 5S ADNr				
CEBADOR	T_m (°C)	TAMAÑO (nt)	SECUENCIA (5' - 3')	FUNCIÓN
5S1	72,4	21	TACGCCCGATCTCGTCCGATC	Directo universal
5S2	69,5	21	CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC	Inverso universal
5S3	67	19	CGGAAGCTAAGCAGGGTCG	Directo común
5SG	68,7	19	TCTTCCCCACACCTGCACC	Específico Oca
5SD	67,8	15	CCGCAAAAGCCCCC	Específico Pato

Los cebadores 5S1 y 5S2, diseñados por Pendás y col., (1995), están basados en la región codificante del gen 5S ADNr de trucha. La localización de estos cebadores corresponde a los nucleótidos 24-45 y 1-21, respectivamente (*Figura 21*).

Los cebadores 5S3, 5SG y 5SD, que se emplearon en una reacción de PCR múltiple, se diseñaron basándonos en las secuencias del gen 5S ADNr de oca y pato, obtenidas tras la amplificación de dicho gen con la pareja de cebadores 5S1 y 5S2. Los cebadores 5SG y 5SD se localizan en el fragmento NTS del gen 5S ADNr, mientras que el cebador 5S3 se localiza en la región conservada (nucleótidos 23-41) del gen 5S ADNr. El cebador 5SG corresponde a los nucleótidos 175-193 del NTS de oca y el cebador 5SD a los nucleótidos 114-128 del NTS de pato.

III.2.2.2. CEBADORES DEL GEN NUCLEAR α -ACTINA

Para la amplificación del gen que codifica la proteína muscular α -actina se emplearon los cebadores Act2 y Act4 (*Tabla 10*). Estos cebadores los diseñaron Watabe y col., (1995) para la amplificación de dicho gen, empleando las secuencias de la proteína α -actina humana y de varias especies animales como la rata, el ratón y el pollo. Los dos cebadores delimitan un fragmento de ADN de aproximadamente 1.000 pb, en las especies estudiadas.

Para conseguir la amplificación de fragmentos específicos en las especies objeto de análisis se diseñaron los cebadores ActG, ActD, ActC, ActP y actinv (*Tabla 11*), basándonos en las secuencias del gen α -actina de oca, pato mulard, pollo y cerdo obtenidas tras la amplificación y secuenciación de dicho gen con los cebadores Act2, Act4 y Act3. El cebador ActG, específico de oca, corresponde a los nucleótidos 813-830 del gen de la α -actina en la oca y se localiza en el tercer intrón de la secuencia de oca. El cebador ActD, específico de pato mulard, corresponde a los nucleótidos 758-777 del gen de la α -actina en el pato mulard y se localiza entre el final del tercer exón y el comienzo del tercer intrón de la secuencia de pato mulard. El cebador ActC corresponde a los nucleótidos 846-864 del gen de la α -actina en el pollo y se localiza en el tercer intrón de la secuencia de pollo y finalmente, el cebador ActP corresponde a los nucleótidos 315-329 del gen de la α -

actina y se localiza en el primer intrón de la secuencia de cerdo. El cebador inverso *actinv* se diseñó en la región codificante conservada (cuarto exón) del gen de la α -actina en las cuatro especies.

Tabla 11. Cebadores empleados para amplificar el gen nuclear α-actina				
CEBADOR	T _m (°C)	TAMAÑO (nt)	SECUENCIA (5' - 3')	FUNCIÓN
Act2	66,6	24	TACCT(GC)ATGAAGATCCTCACTGAG	Directo Universal
Act4	70	23	TCCTGCTTGGTGATCCACATCTG	Inverso Universal
Act3	54,4	17	AGGTCCTTCCTGATGTC	Para secuenciar
ActD	54,2	20	GAAGATCAAGGTAAGGGTAC	Específico Pato
ActG	67,3	18	TCTTTTGCCCTCATGCGG	Específico Oca
ActC	67,6	19	CGTGACACCTGTGGTGGCT	Específico Pollo
ActP	67,5	15	GGGCGCTCTGTCCGC	Específico Cerdo
Actinv	68,9	22	CCTGCTTGGTGATCCACATCTG	Inverso común

III.2.2.3. CEBADORES DEL GEN MITOCONDRIAL 12S ARNr

Para la amplificación del gen mitocondrial 12S ARNr se utilizaron los siguientes cebadores:

Los oligonucleótidos 12SFW, 12SREV, 12SFWM y 12SSEQ (*Tabla 12*) se emplearon para amplificar y secuenciar un fragmento del gen mitocondrial 12S ARNr en las distintas especies animales estudiadas.

Posteriormente, se procedió al diseño de cebadores para amplificar fragmentos específicos de cada una de las especies animales objeto de análisis. Los cebadores inversos 12SG, 12SD, 12SC, 12ST, 12SS, 12SCH, 12SBT y 12SOA (*Tabla 12*) amplificaron específicamente muestras de oca, pato, pollo, pavo, cerdo, cabra, vaca y oveja, respectivamente, y permitieron la amplificación por PCR de regiones de longitud específica del gen 12S ARNr en las ocho especies analizadas.

Tabla 12. Cebadores empleados para amplificar el gen mitocondrial 12S ARNr

CEBADOR	T _m (°C)	TAMAÑO (nt)	SECUENCIA (5' - 3')	FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN (NUCLEÓTIDOS)
12SREV	67,1	27	TCCGGTACACTTACCTTGTTACGACTT	Inverso para secuenciar	
12SFW	66,2	26	CCACCTAGAGGAGCCTGTTCT(AG)TAAT	Directo para secuenciar	
12SSEQ	64,0	25	TCCAGTATGCTTACCTTGTTACGAC	Inverso para secuenciar	
12SFWM	63,5	28	CTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAA	Directo para secuenciar	
12SG	65,4	22	CTAAATCCGCCTTCCAGAAATG	Específico Oca	223-244
12SD	66,4	25	CACTTACCTCATCTTTGGCATTGAC	Específico Pato	349-373
12SC	66,7	23	CCGTCTTAAAGTGAGCTTAGCGG	Específico Pollo	263-285
12ST	64,0	27	TTGAGCTCACTATTGATCTTTCAGTTT	Específico Pavo	96-122
12SS	65,3	23	GTTACGACTTGTCTCTTCGTGCA	Específico Cerdo	365-387
12SCH	65,7	25	TGACCTAACGTCTTTATGTGTGGTG	Específico Cabra	118-142
12SBT	66,1	24	TGGTTTCATAATAACTTTCGCGCT	Específico Vaca	200-223
12SOA	65,5	24	GTCTCCTCTCGTGTGGTTGAGATA	Específico Oveja	348-371

III.2.3. EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de *foie gras* de oca y pato, y a partir de hígado, tejido muscular y tejido graso de pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra. Para ello se empleó el método de DeSalle y col., (1993) con ligeras modificaciones. Alternativamente, se utilizaron dos *kit* comerciales de Promega: *Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food* y *Wizard[®] DNA Clean-up*.

A continuación se describen los protocolos de extracción de ADN utilizados en este trabajo.

III.2.3.1. MÉTODO DE DESALLE y col., (1993)

La extracción del ADN de las muestras de *foie gras*, hígado, tejido muscular o grasa se realizó de acuerdo al método de DeSalle y col., (1993) que permite extraer ADN total (genómico y mitocondrial) a partir de tejidos animales (*Figura 22*). Se homogeneizaron 100 mg de muestra en 500 μ L del tampón de extracción TSM (Tris 0,2 M; EDTA 0,1 M; SDS 1%) y 6 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). Las muestras se incubaron a 55°C en agitación durante 15 horas. Después de la incubación, los tubos se colocaron en hielo durante 30 min, se centrifugaron a 11.500 x g durante 10 min y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios. El ADN se extrajo dos veces con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y otra vez con un volumen igual de cloroformo. Seguidamente, el ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol a -20°C durante 30 min, se centrifugó a 15.000 x g 10 min, se descartó el etanol y el precipitado de ADN se resuspendió en 500 μ L de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM).

A continuación, se añadieron 50 μ L de acetato amónico 50 mM y 1 mL de etanol absoluto para precipitar el ADN por segunda vez. Tras invertir varias veces el tubo, se dejó reposar 20 min a -20°C. Finalmente, se centrifugó a 15.000 x g durante 10 min, se descartó el etanol y se dejó secar el sedimento de ADN, que se resuspendió posteriormente en 100 μ L de agua bidestilada estéril.

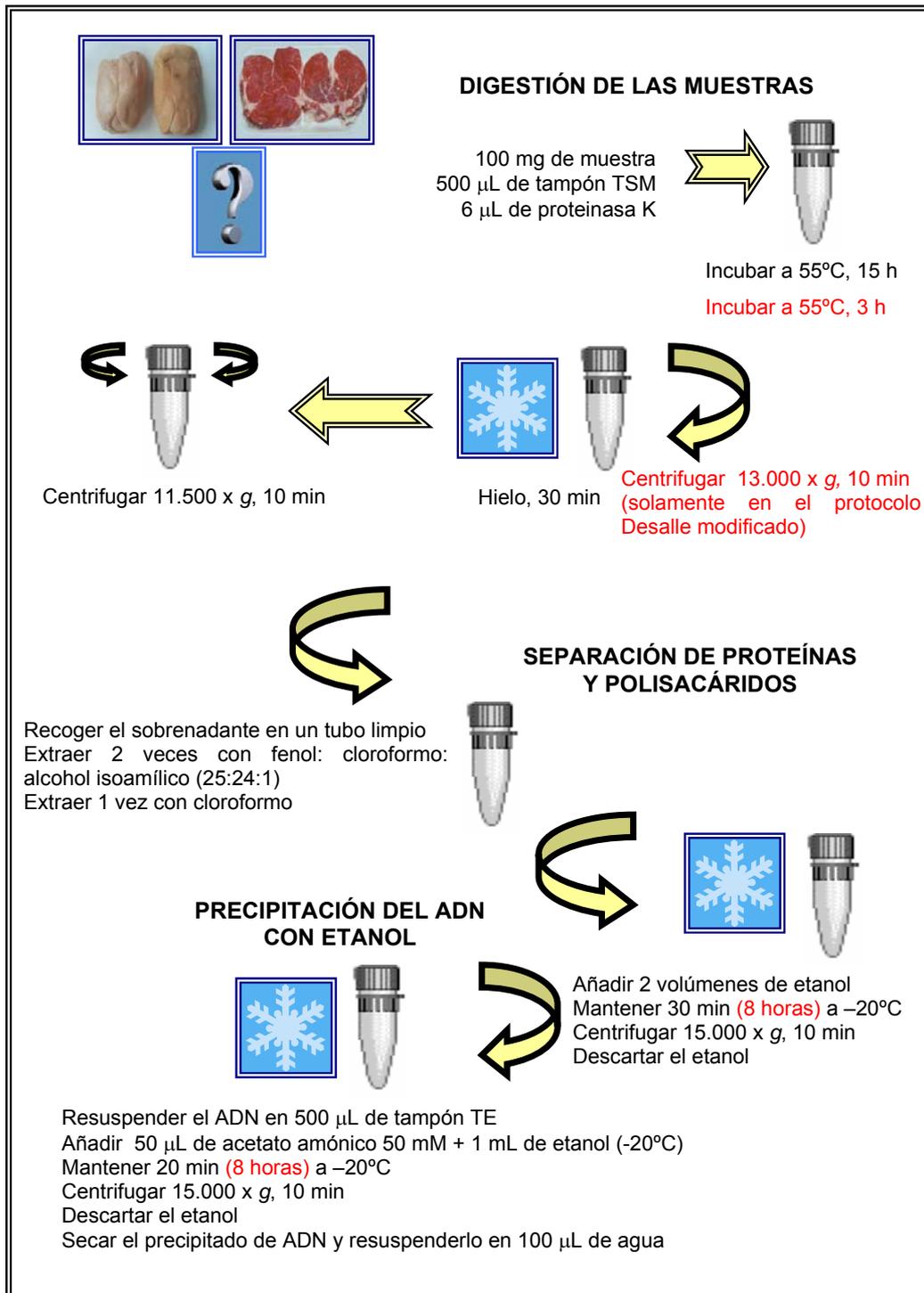


Figura 22. Método de extracción de ADN (DeSalle y col., 1993 y DeSalle y col., 1993 modificado).

Con este método se obtuvo ADN de elevado tamaño molecular (hasta 4.000 pb), aunque degradado. Sin embargo, cuando se utilizaron estos ADNs para amplificar el gen nuclear 5S ADNr por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores universales, no se consiguió amplificar el gen seleccionado. La ausencia de amplificación se atribuyó a la presencia de inhibidores de la reacción de PCR, que se hubieran podido extraer conjuntamente con el ADN.

III.2.3.2. MÉTODO DE DESALLE y col., (1993) MODIFICADO

El método de DeSalle y col., (1993) descrito anteriormente se modificó ligeramente para eliminar la grasa presente en las muestras de *foie gras* analizadas (*Figura 22*).

Para ello, las muestras de *foie gras* se lisaron en tampón TSM con proteinasa K durante tres horas a 55°C, y se centrifugaron a 13.000 x g, durante 10 min. La capa grasa que se depositaba en la parte superior del tubo, así como el sedimento, que contenía restos celulares, se retiraron cuidadosamente, recogiendo únicamente la fase intermedia que contenía los ácidos nucleicos. El ADN se extrajo dos veces con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), otra vez con un volumen igual de cloroformo y se precipitó dos veces con etanol durante 8 horas cada vez. Con este protocolo se obtuvo un ADN de buena calidad que permitió la amplificación de los genes seleccionados mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

III.2.3.3. MÉTODO Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food

Este protocolo (*Figura 23*) se basa en la unión de los ácidos nucleicos a partículas paramagnéticas (*MagneSil™ Paramagnetic Particles PMPs*) que actúan como “fase sólida móvil” permitiendo la separación del ADN del resto de componentes presentes en la muestra (proteínas, sales, etc).

Se emplearon 200 mg de muestra, a los que se añadieron 500 µL de tampón de lisis A y 5 µL de ARNasa A. La mezcla se agitó vigorosamente y se añadieron 250 µL de tampón de lisis B. Tras agitar la mezcla durante 10-15 s, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se añadieron 750 µL de “Solución de Precipitación” y se mezcló vigorosamente el contenido.

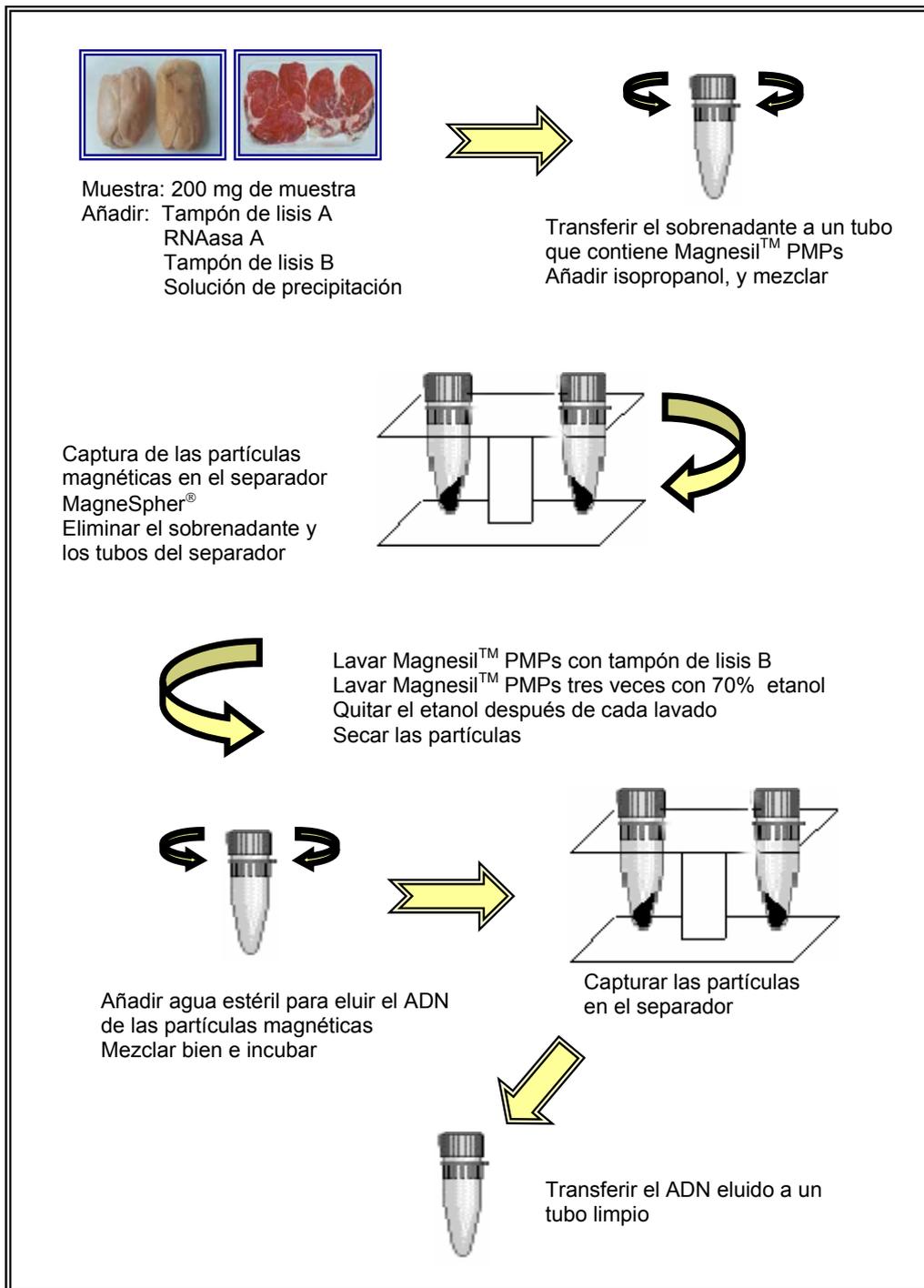


Figura 23. Método de extracción Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food (Promega).

Después, se centrifugó a 15.000 x g durante 10 min para eliminar los restos celulares y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de 2 mL. Se añadieron al sobrenadante 50 µL de *MagnesiITM PMPs* y, tras agitar vigorosamente la mezcla, se añadieron 0,8 volúmenes de isopropanol. Se invirtió el tubo de 10 a 15 veces para mezclar bien el contenido y la mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, se colocó el tubo durante 1 min en el separador de partículas magnéticas *MagneSpher[®]* y se retiró el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta. Seguidamente, se añadieron 250 µL de tampón de lisis B al tubo que contenía las partículas magnéticas. Se invirtió el tubo de 2 a 3 veces para permitir una buena homogeneización del contenido y se colocó de nuevo en el separador *MagneSpher[®]* durante 1 min. Se retiró el sobrenadante, se añadió 1 mL de etanol al 70% para lavar el ADN y se situó en el separador *MagneSpher[®]*. Tras 1 min de espera, se eliminó el sobrenadante y se repitió tres veces el lavado con etanol. Tras descartar el etanol, se secaron las partículas magnéticas a temperatura ambiente durante 15-30 min, y se eluyó el ADN añadiendo 100 µL de agua bidestilada estéril. Se agitó el contenido del tubo para facilitar la elución y se incubó a 65°C durante 5 min. Finalmente, el tubo se introdujo de nuevo en el separador de partículas magnéticas durante 1 min y se recogió el ADN cuidadosamente con una pipeta, transfiriéndolo a un tubo limpio.

III.2.3.4. MÉTODO *Wizard[®] DNA Clean-up*

Para la extracción del ADN se homogeneizaron 2 g de muestra (*foie gras*, hígado, músculo, grasa o mezcla binaria) con 8,6 mL de tampón de extracción (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, 1% SDS, pH 8,0), 1 mL 5M Guanidinio cloruro 5M y 200 µL de proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL. Las muestras se incubaron toda la noche a 55°C en agitación a 60 rpm, y después se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron 5 mL de cloroformo al lisado y posteriormente se centrifugó a 11.500 x g durante 10 min. Para extraer el ADN, se mezclaron 500 µL del sobrenadante obtenido tras la centrifugación (fase acuosa) con 1 mL de la resina del *kit Wizard[®] DNA Clean-Up System* (Promega). La mezcla resina/sobrenadante se pipeteó en el interior de la jeringa, que estaba acoplada a una minicolumna y se aplicó vacío para favorecer el paso de la muestra a través de la minicolumna. A continuación se lavó la columna mediante la adición de 2 mL de

isopropanol al 80% a la jeringa y la aplicación de vacío. La minicolumna se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó durante 2 min a 10.000 x *g* para eliminar los restos de alcohol. Finalmente, la minicolumna se colocó nuevamente en un tubo limpio y el ADN se eluyó añadiendo 50-100 μ L de agua bidestilada estéril y centrifugando durante 20 s a 10.000 x *g*. La concentración de ADN se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm (*Figura 24*).

III.2.4. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DEL ADN

Una vez extraído el ADN de los distintos tejidos mediante los protocolos descritos en el apartado anterior, se procedió a evaluar la calidad y concentración del mismo. Para determinar la calidad del ADN se analizaron dos parámetros: integridad y pureza (Maniatis y col., 1982).

III.2.4.1. INTEGRIDAD DEL ADN

Una medida directa de la calidad de un ADN es su grado de integridad. La presencia de un ADN muy degradado indica que la muestra ha sido sometida a un procesado muy intenso, que se ha almacenado durante demasiado tiempo y/o en malas condiciones, o que el protocolo de extracción utilizado resulta excesivamente destructivo. En cualquier caso, cuanto mayor sea la fragmentación del ADN de una muestra, menor es el número de copias intactas de un gen que se encuentran presentes y, por tanto, resulta más difícil la amplificación del mismo por PCR.

La integridad del ADN extraído de los distintos tejidos animales se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa (técnica descrita en el apartado III.2.6). Para ello, las muestras de ADN (1 μ g, aproximadamente) se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa D-1 (Pronadisa) al 1,5% en tampón TAE (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA) al que se incorporó 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio. A continuación, las bandas correspondientes a los ADNs de las muestras se compararon con un marcador de tamaño molecular de ADN.

Cuanto mayor es la integridad del ADN extraído, mayor es el tamaño de la banda que se observa y más definida se encuentra en el gel. Bandas de tamaño molecular pequeño y difuminadas en el gel indican, sin embargo, un alto grado de degradación en el ADN (Maniatis y col., 1982).

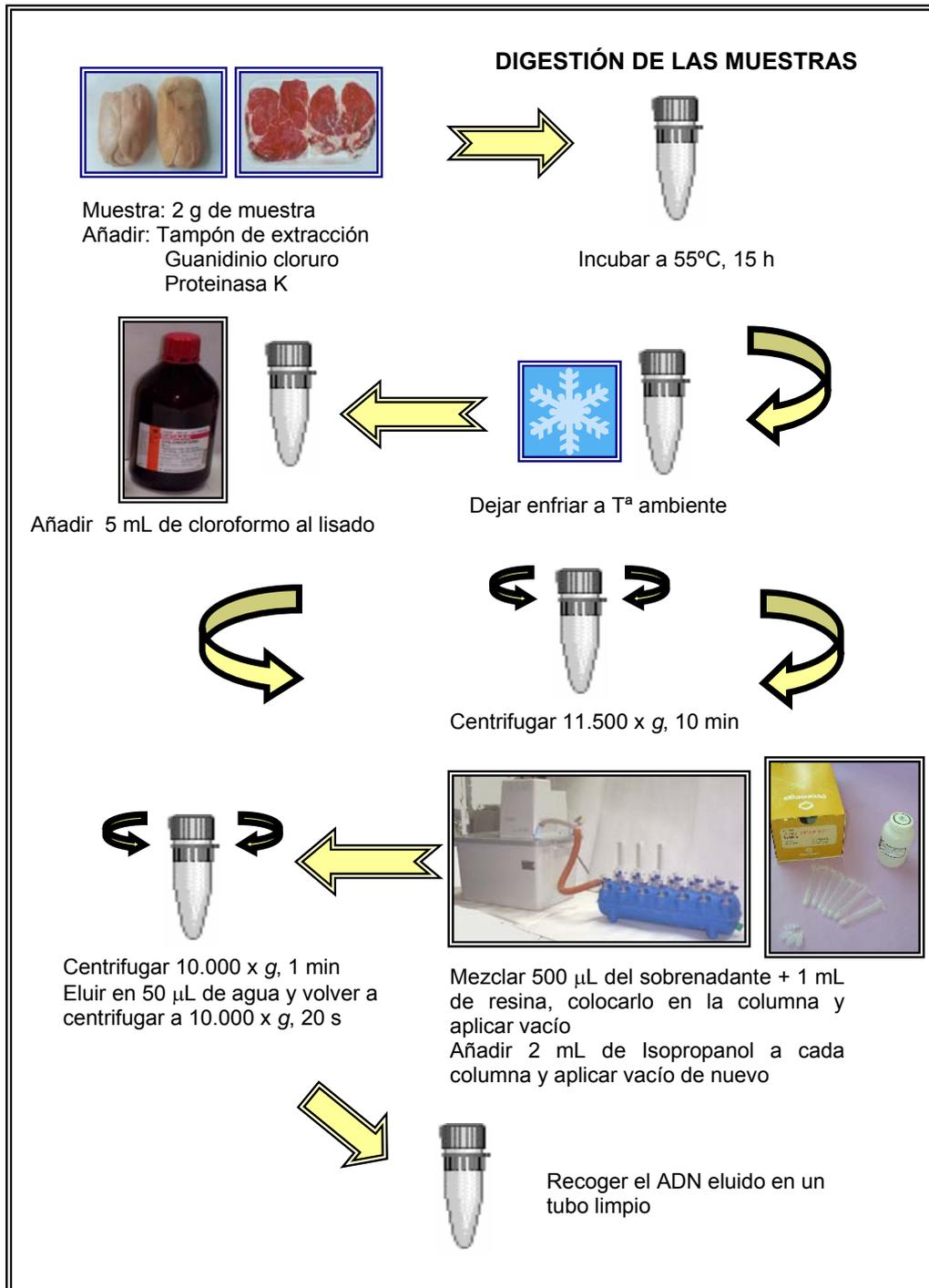


Figura 24. Método de extracción *Wizard® DNA Clean-up* (Promega).

III.2.4.2. PUREZA DEL ADN

Al igual que el grado de integridad, la pureza de un ADN es un indicador de su calidad. Una alta concentración de proteínas, fenol o sales minerales en el ADN extraído, pueden dificultar en gran medida la amplificación del mismo por PCR.

La pureza del ADN se determinó mediante espectrofotometría de absorción. Para ello se realizaron lecturas de absorbancia de la muestra a 230 nm (λ de máxima absorción de sales minerales), 260 nm (λ de máxima absorción de ARN y ADN) y 280 nm (λ de máxima absorción de proteínas y fenol). Una muestra de ADN pura presenta una relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ comprendida entre 1,8-2,0. Si existe contaminación con proteínas o fenol, la relación será significativamente menor. Por otro lado, la relación $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ debe estar comprendida entre 0,3 y 0,7. Un valor superior indicaría la presencia de un alto contenido en sales en la muestra (Maniatis y col., 1982).

III.2.4.3. CONCENTRACIÓN DEL ADN

La concentración de ADN de una muestra se puede valorar mediante electroforesis en gel de agarosa. Esto se consigue comparando la intensidad de la banda correspondiente a la muestra problema con bandas de patrones de concentración conocida. La comparación puede ser visual, obteniendo así resultados aproximados, o se pueden utilizar sistemas informáticos de análisis de imágenes que permiten obtener datos más precisos mediante la realización de curvas de calibrado (Maniatis y col., 1982). En este trabajo se utilizó el patrón de concentración de ADN Mass Ruler (Bio-Rad) y el sistema de análisis de imágenes Geldoc 1000 UV (Bio-Rad).

La medida de absorbancia a 260 nm (λ de máxima absorción de ARN y ADN) de una dilución determinada de la muestra también permite calcular la concentración de ADN de la misma. Teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN bicatenario (Sambrook y col., 1989), si multiplicamos la lectura de absorbancia por el factor correspondiente y por la dilución empleada, obtendremos la concentración de ADN de la muestra.

III.2.5. AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES GÉNICOS SELECCIONADOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los fragmentos génicos seleccionados como marcadores para la identificación de oca, pato, pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se realizó a partir del ADN extraído de las muestras (apartado III.2.3), utilizando los cebadores descritos en el apartado III.2.2.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 50 μ L, utilizando tubos de polipropileno estériles de pared fina y capacidad para 0,6 mL. Los componentes de la reacción fueron los siguientes:

- Tampón de PCR (Tris-HCl 75 mM, pH 9,0; KCl 50 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM; BSA 0,001%) suministrado por el fabricante a una concentración 10 veces superior a la de uso.
- Cl_2Mg
- Cebadores
- dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 200 μ M
- ADN polimerasa Biotools (procedente de la bacteria termófila *Thermus thermophilus* expresada en *Escherichia coli*), en un tampón que contiene 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; Triton X-100 0,1% y glicerol 50% (v/v).
- ADN
- Agua para síntesis de ADN

Las concentraciones óptimas de ADN, cebadores y cloruro magnésico se determinaron para cada gen y juego de cebadores utilizado. Para evitar contaminaciones, la preparación de las reacciones se realizó en una campana de flujo laminar equipada con lámpara ultravioleta. En todos los ensayos se verificó la ausencia de contaminación mediante una reacción de control negativo a la que no se incorporó ADN.

La determinación de las temperaturas y tiempos óptimos de los ciclos de amplificación programados en el termociclador para cada fragmento génico, se realizó empíricamente en función de las características del fragmento y de la T_m de los cebadores empleados.

Una vez finalizados los ciclos de temperatura programados, los productos de PCR obtenidos se conservaron a 4°C. Tras comprobar el resultado de la amplificación mediante electroforesis, los tubos se almacenaron a -20°C para análisis posteriores.

A continuación se describen los fragmentos génicos delimitados por cada una de las parejas de cebadores empleados (*Tabla 13*), así como las condiciones utilizadas para su amplificación por PCR.

III.2.5.1. GEN NUCLEAR 5S ADN_r

III.2.5.1.1. Cebadores 5S1 y 5S2

La pareja de cebadores 5S1 y 5S2 se utilizó para amplificar un fragmento del gen nuclear 5S ADN_r de oca (con un tamaño de 237 pb), y un fragmento del gen 5S ADN_r de pato (de 246 pb), que corresponden a una unidad del gen 5S ADN_r. En ocasiones se amplificaron varios fragmentos, correspondientes a 1, 2 o incluso 3 unidades del gen 5S ADN_r.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 µL con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 µM, 2 U de ADN polimerasa, MgCl₂ 2 mM, 500 ng de ADN, 10 pmol de cada uno de los cebadores y agua para la síntesis de ADN.

Una vez mezclados todos los componentes de la reacción, los tubos se sometieron a los siguientes ciclos de tiempo y temperatura:

Tabla 13. Fragmentos génicos delimitados en la oca, pato, pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra con las parejas de cebadores empleadas en este trabajo

GEN	CEBADORES	TAMAÑO DEL FRAGMENTO (pb)	ESPECIE AMPLIFICADA	
5S ADNr	5S1-5S2	237	Oca	
		246	Pato	
	5S3-5SG	171	Oca	
	5S3-5SD	106	Pato	
α-actina	PA2-PA4	985	Oca	
		983	Pato	
		1.000	Pollo	
		707	Cerdo	
	ActG-actinv	172	Oca	
	ActD-actinv	225	Pato	
	ActC-actinv	154	Pollo	
	ActP-actinv	392	Cerdo	
	12S ARNr	12SFW-12SREV	392	Oca
			394	Pato
		402	Pollo	
		404	Cerdo	
		400	Pavo	
12SFW-12SG		244	Oca	
12SFW-12SD		373	Pato	
12SFW-12SC		285	Pollo	
12SFW-12SP		387	Cerdo	
12SFW-12ST		122	Pavo	
12SFWM-12SSEQ		399	Vaca	
		398	Oveja	
		397	Cabra	
		400	Cerdo	
12SFWM-12SBT		223	Vaca	
12SFWM-12SOA		371	Oveja	
12SFWM-12SCH	142	Cabra		
12SFWM-12SP	383	Cerdo		

94°C	3 min	}	x 1 ciclo
94°C	45 s	}	x 35 ciclos
63°C	45 s		
72°C	45 s		
72°C	5 min	}	x 1 ciclo

III.2.5.1.2. Cebadores 5S3, 5SG y 5SD

Los cebadores 5S3 (cebador directo), 5SG y 5SD (cebadores inversos) se utilizaron para amplificar un fragmento de 171 pb del gen 5S ADNr en las muestras de oca y de 106 pb en las muestras de pato.

Las reacciones de PCR se prepararon en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, salvo que se utilizaron 20 ng de ADN y que la temperatura de hibridación fue de 66°C. Inicialmente, estos oligonucleótidos se analizaron en dos reacciones independientes de PCR (5S3-5SG y 5S3-5SD). Posteriormente, los tres cebadores (5S3, 5SG y 5SD) se mezclaron en la misma proporción (5 pmol cada uno) y se emplearon juntos en un formato de PCR múltiple.

III.2.5.2. GEN NUCLEAR α -ACTINA

Los cebadores Act2 y Act4 se utilizaron para amplificar un fragmento de 985 pb, 983 pb, 1.000 pb y 707 pb del gen nuclear que codifica la proteína α -actina, a partir de muestras de oca, pato, pollo y cerdo.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μ L con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μ M, 2 U de ADN polimerasa, $MgCl_2$ 2 mM, 3.000-4.000 ng de ADN, 100 pmol de cada uno de los cebadores y agua para la síntesis de ADN.

Una vez mezclados todos los componentes de la reacción, los tubos se sometieron a los siguientes ciclos de tiempo y temperatura:

93°C	3 min	} x 1 ciclo
93°C	1 min	} x 35 ciclos
65°C	1,5 min	
72°C	2 min	
72°C	5 min	} x 1 ciclo

III.2.5.2.1. Cebadores *actinv*, *ActG*, *ActD*, *ActC* y *ActP*

Con el fin de conseguir la identificación específica de las 4 especies objeto de análisis, se diseñaron 5 cebadores: *actinv* (cebador inverso) y *ActG*, *ActD*, *ActC* y *ActP* (cebadores directos). Estos cebadores se utilizaron para amplificar un fragmento de 172 pb, 225 pb, 154 pb y 392 pb del gen nuclear que codifica la proteína α -actina, a partir de muestras de oca, pato, pollo y cerdo.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μ L con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μ M, 2 U de ADN polimerasa, $MgCl_2$ 2 mM, 500 ng de ADN, 10 pmol de cada uno de los cebadores y agua para la síntesis de ADN.

Una vez mezclados todos los componentes de la reacción, los tubos se sometieron a los siguientes ciclos de tiempo y temperatura:

93°C	3 min	} x 1 ciclo
93°C	1 min	} x 35 ciclos
65°C*	1 min	
72°C	2 min	
72°C	5 min	} x 1 ciclo

*55°C al usar el cebador *ActD*

III.2.5.3. GEN MITOCONDRIAL 12S ARNr

III.2.5.3.1. Cebadores 12SFW/12SREV y 12SFWM/12SSEQ

La pareja de cebadores 12SFW/12SREV se utilizó para amplificar un fragmento de aproximadamente 400 pb del gen mitocondrial 12S ARNr de oca, pato, pollo, pavo

y cerdo. Asimismo, la pareja de cebadores 12SFWM/12SSEQ se empleó para amplificar un fragmento similar en vaca, oveja, cabra y cerdo.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μ L con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μ M, 2 U de ADN polimerasa, $MgCl_2$ 2 mM, 150-200 ng de ADN, 5 pmol de cada uno de los cebadores y agua para la síntesis de ADN.

Una vez mezclados todos los componentes de la reacción, los tubos se sometieron a los siguientes ciclos de tiempo y temperatura:

93°C	2 min	}	x 1 ciclo
93°C	30 s		
63°C	30 s	}	x 35 ciclos
72°C	45 s		
72°C	5 min	}	x 1 ciclo

III.2.5.3.2. Cebadores 12SFW, 12SG, 12SD, 12SC, 12ST y 12SP

El cebador directo, 12SFW y los inversos 12SG, 12SD, 12SC, 12ST y 12SP, se utilizaron para la amplificación de fragmentos de 244 pb, 373 pb, 285 pb, 122 pb y 387 pb del gen 12S ARNr de oca, pato, pollo, pavo y cerdo.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μ L con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μ M, 2 U de ADN polimerasa, $MgCl_2$ 1,5 mM, 500-750 ng de ADN, 5 pmol de cada uno de los cebadores y agua para la síntesis de ADN.

Los ciclos de tiempo y temperatura fueron los mismos que se describen para los cebadores 12SFW/12SREV y 12SFWM/12SSEQ.

III.2.5.3.3. Cebadores 12SFWM, 12SBT, 12SOA, 12SCH y 12SP

El cebador directo 12SFWM y los inversos 12SBT, 12SOA, 12SCH y 12SP, se utilizaron para la amplificación de fragmentos de 223 pb, 371 pb, 142 pb, y 383 pb del gen 12S ARNr de vaca, oveja, cabra y cerdo.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μL con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μM , 2 U de ADN polimerasa, MgCl_2 1,5 mM, 500-750 ng de ADN, 5 pmol de cada uno de los cebadores y agua para la síntesis de ADN.

Los ciclos de tiempo y temperatura fueron los mismos que se describen para los cebadores 12SFW/12SREV y 12SFWM/12SSEQ.

III.2.6. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Una vez amplificados por PCR los fragmentos génicos seleccionados, estos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para visualizar las bandas de ADN obtenidas. Las moléculas de ADN, cargadas negativamente al pH del análisis (pH= 8,0), migran a través del gel hacia el ánodo cuando se aplica una corriente eléctrica. Esta migración es inversamente proporcional al \log_{10} del número de pares de bases, de modo que las moléculas con un peso molecular mayor migran más lentamente que las de peso molecular inferior (Slater y col., 1996).

III.2.6.1. TAMPONES, GELES Y SOLUCIONES EMPLEADAS

- Gel

Se compone de agarosa D-1 (Pronadisa) al 1,5% disuelta en tampón TAE, y bromuro de etidio a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El bromuro de etidio permite visualizar el ADN bajo luz ultravioleta.

- Tampón Tris Acetato (TAE) 50X

Tris Base	240	g
Ácido acético glacial	57,1	mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	100	mL
Agua bidestilada csp	1.000	mL

Diluir 1:50 con agua destilada estéril antes de utilizar.

- Solución de carga (GLS, Gel Loading Solution)

Azul de bromofenol	0,05%	(p/v)
Glicerol	60 %	(p/v)
Agua bidestilada	resto	

- Patrón 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL)

Este patrón contiene 15 fragmentos de ADN de entre 100 y 1.500 pb, que difieren entre ellos en 100 pb, y un fragmento adicional de 2.072 pb. La intensidad de la banda de 600 pb es, aproximadamente, 2 ó 3 veces mayor que la del resto de bandas.

- Patrón Mass Ruler (Bio-Rad)

Este patrón consiste en cinco fragmentos de ADN de peso molecular y concentración conocidos: 2,5 µL del patrón contienen 10 ng de la banda de 100 pb, 20 ng de la de 200 pb, 50 ng de la de 500 pb, 70 ng de la de 700 pb y 100 ng de la banda de 1.000 pb.

- Patrón 1Kb Plus DNA Ladder™ (Gibco BRL)

Contiene 20 fragmentos de ADN con tamaños comprendidos entre 1.000 pb y 12 Kb: doce bandas de entre 1.000 pb y 12.000 pb en incrementos de 1.000 pb, y ocho bandas en el intervalo de 100 pb a 1.000 pb, cuyos tamaños (expresados en pb) son de 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850 y 1.000.

- Patrón Supercoiled DNA Ladder™ (Invitrogen)

Contiene 11 fragmentos de ADN con tamaños comprendidos entre 2.067 pb y 16.210 pb siendo el incremento entre las bandas de aproximadamente 1.000 pb. Se emplea como patrón en el ADN circular.

III.2.6.2. PREPARACIÓN DEL GEL

La agarosa se disolvió en tampón TAE en un matraz Erlenmeyer, calentando la mezcla hasta ebullición en un horno microondas. A continuación, la solución se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 50°C y se añadieron 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Finalmente, el gel se vertió en la cubeta de electroforesis y se introdujo el peine formador de pocillos.

Una vez polimerizado el gel, el peine se retiró cuidadosamente y se añadió un volumen de tampón de electroforesis TAE suficiente para cubrirlo totalmente, quedando así listo para depositar las muestras en los pocillos.

III.2.6.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los productos de PCR (10 μ L) se mezclaron con 2 μ L de GLS y se depositaron en los pocillos del gel. En todos los ensayos se depositó, en uno de los pocillos, un patrón de ADN de tamaño molecular conocido.

III.2.6.4. CONDICIONES DE SEPARACIÓN

Las electroforesis se realizaron manteniendo un voltaje constante (100 V) durante un tiempo de aproximadamente 40 min. Finalizada la electroforesis, las bandas de ADN se visualizaron en el gel utilizando un transiluminador de luz ultravioleta. La imagen obtenida se registró mediante un sistema de documentación de geles GelDoc System 1000 PC (BioRad) (*Figura 25*).



Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de los fragmentos de ADN.

III.2.7. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS POR PCR

III.2.7.1. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Para llevar a cabo la secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR conviene purificar previamente dichos fragmentos, es decir, eliminar los restos de aquellos reactivos no utilizados en la reacción de amplificación (fundamentalmente los cebadores), ya que estos pueden interferir en la reacción de secuenciación.

La purificación de productos amplificados por PCR se realiza escindiendo las correspondientes bandas electroforéticas de ADN de un gel de agarosa de bajo punto de fusión. El fragmento de gel que contiene la banda de interés, posteriormente se funde y el ADN se recupera tras el empleo de diferentes solventes y tampones.

El procedimiento de purificación empleado en este trabajo fue el siguiente: 120 μ L del producto amplificado se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa LM-2 (Pronadisa) al 1%, con 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio, a 100 V durante 40 min. La banda de ADN se cortó del gel con una cuchilla estéril y bajo luz ultravioleta. A continuación, se purificó la banda utilizando el *kit* de extracción *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante (*Figura 26*):

- La banda de ADN se incubó con tres volúmenes del tampón QG (suministrado con el *kit* de extracción) durante 10 min a 50°C. Una vez disuelta la banda en el tampón, la mezcla adquirió un color amarillo, indicador de que el pH era de 7,5, es decir, adecuado para la absorción del ADN a la matriz de la columna.
- Se añadió al gel disuelto un volumen igual de isopropanol y se agitó para conseguir una mezcla homogénea.
- A continuación, la mezcla se aplicó en una columna *QIAquick* introducida en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó durante 1 min a 10.000 x *g*.
- Una vez descartado el líquido de elución, se añadieron a la columna 0,5 mL de tampón QG y se centrifugó de nuevo durante 1 min a 10.000 x *g*.

- Posteriormente, la columna de purificación se lavó añadiendo 0,75 mL del tampón *PE* (suministrado con el *kit* de extracción) y se centrifugó durante 1 min a 10.000 x *g*.
- Finalmente, la columna se introdujo en un tubo limpio y el ADN se eluyó de la matriz con 25 μ L de agua miliQ estéril, mediante centrifugación a 10.000 x *g* durante 1 min.



Figura 26. Purificación de productos de PCR utilizando el *kit* de purificación *Qiaquick gel extraction* (Qiagen).

Este protocolo se empleó para la purificación de cada uno de los siguientes fragmentos de ADN tras su amplificación por PCR (*Tabla 12*):

- Gen 5S ADNr: un fragmento de 237 pb de oca y de 246 pb de pato.
- Gen α -actina: un fragmento de 985 pb, 983 pb, 1.000 pb y 707 pb en muestras de oca, pato, pollo y cerdo.
- Gen 12S ARNr: un fragmento de 392 pb, 394 pb, 402 pb, 404 pb y 400 pb en muestras de oca, pato, pollo, cerdo y pavo. Asimismo se purificó un fragmento de 399 pb, 398 pb, 397 pb y 400 pb en muestras de vaca, oveja, cabra y cerdo.

III.2.7.2. CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Tras la purificación, con el fin de conseguir la secuenciación del fragmento completo del gen 5S ADNr, amplificado en el pato y en la oca con los cebadores 5S1 y 5S2, fue necesaria su clonación en un vector, como paso previo a la secuenciación. Igualmente, se procedió a la clonación de los fragmentos amplificados con los cebadores Act2 y Act4 en oca, pato, pollo y cerdo. Además, para la realización de una recta estándar, necesaria en el desarrollo del PCR cuantitativo, se procedió a la clonación previa de un fragmento de 394 pb procedente de ADN de pato, amplificado con los cebadores 12SFW y 12SREV, y de un fragmento de 411 pb de ADN de cerdo amplificado con los cebadores 12STAQMANM y 12STAQMANS (ver sección III.2.9).

Para ello, se empleó el *kit* comercial *pGEM[®]-T Easy Vector System II* (Promega), que contiene el vector de clonación plasmídico denominado *pGEM[®]-T Easy*. Este vector está abierto con la enzima de restricción *Eco RV*. En ambos extremos 3' del punto de corte, lugar donde se inserta el fragmento de ADN de interés, se han añadido residuos de timidina (T) (*Figura 27*). La adición de timinas mejora la eficiencia de ligación (unión del producto de PCR en el vector), ya que previene la recircularización del mismo. La región del vector donde se inserta el ADN se denomina MCS (lugar con múltiples sitios de clonación), y está flanqueada por los promotores de la ARN polimerasa T7 y SP6. Además, se encuentra dentro de la región que contiene el gen que codifica el α -péptido de la enzima β -galactosidasa

(gen *lac Z*), de modo que cuando se inserta en el MCS del vector un fragmento de ADN, el gen *lac Z* se inactiva impidiéndose la síntesis de dicha enzima.

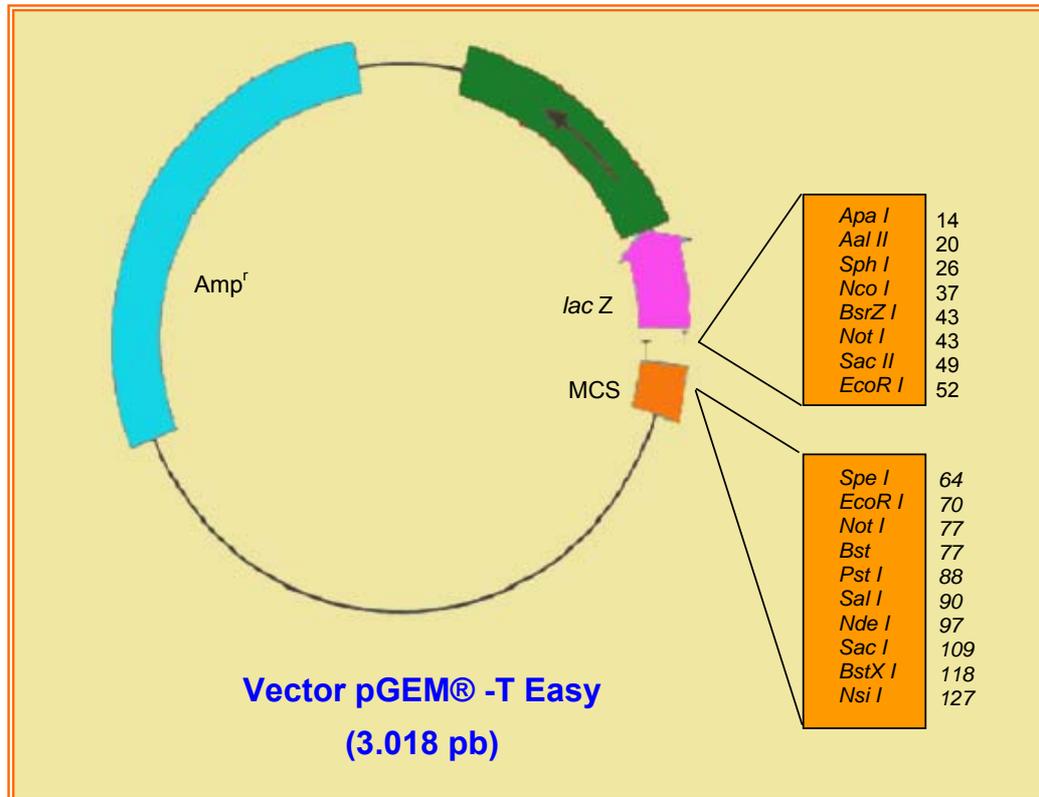


Figura 27. Mapa circular del vector de clonación *pGEM®-T Easy*.

Una vez que ha tenido lugar la ligación, el vector recombinante (vector con el inserto de ADN) se introduce en una célula hospedadora (células competentes de *Escherichia coli* JM109, suministradas con el *kit*), para permitir su propagación. A este proceso se le denomina transformación. Las células competentes, una vez transformadas, se siembran en placas de petri que contienen medio LB con ampicilina (antibiótico cuya resistencia está codificada en el vector), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa (X-Gal), e isopropil- β -D-tiogalactopirano (IPTG). El X-Gal es un compuesto cromógeno que es degradado enzimáticamente por la enzima β -galactosidasa, originando un compuesto de color azul. El IPTG es un inductor del promotor del gen *lac Z*. Por lo tanto, las colonias de *Escherichia coli* que han recibido un vector que contiene un inserto de ADN, al tener inactivado el gen de la β -galactosidasa son incapaces de hidrolizar el X-Gal, por lo que son de

color blanco. Sin embargo, aquellas colonias que tras la transformación no han recibido el inserto aparecen de color azul, al poseer la enzima β -galactosidasa funcional (Figura 28).

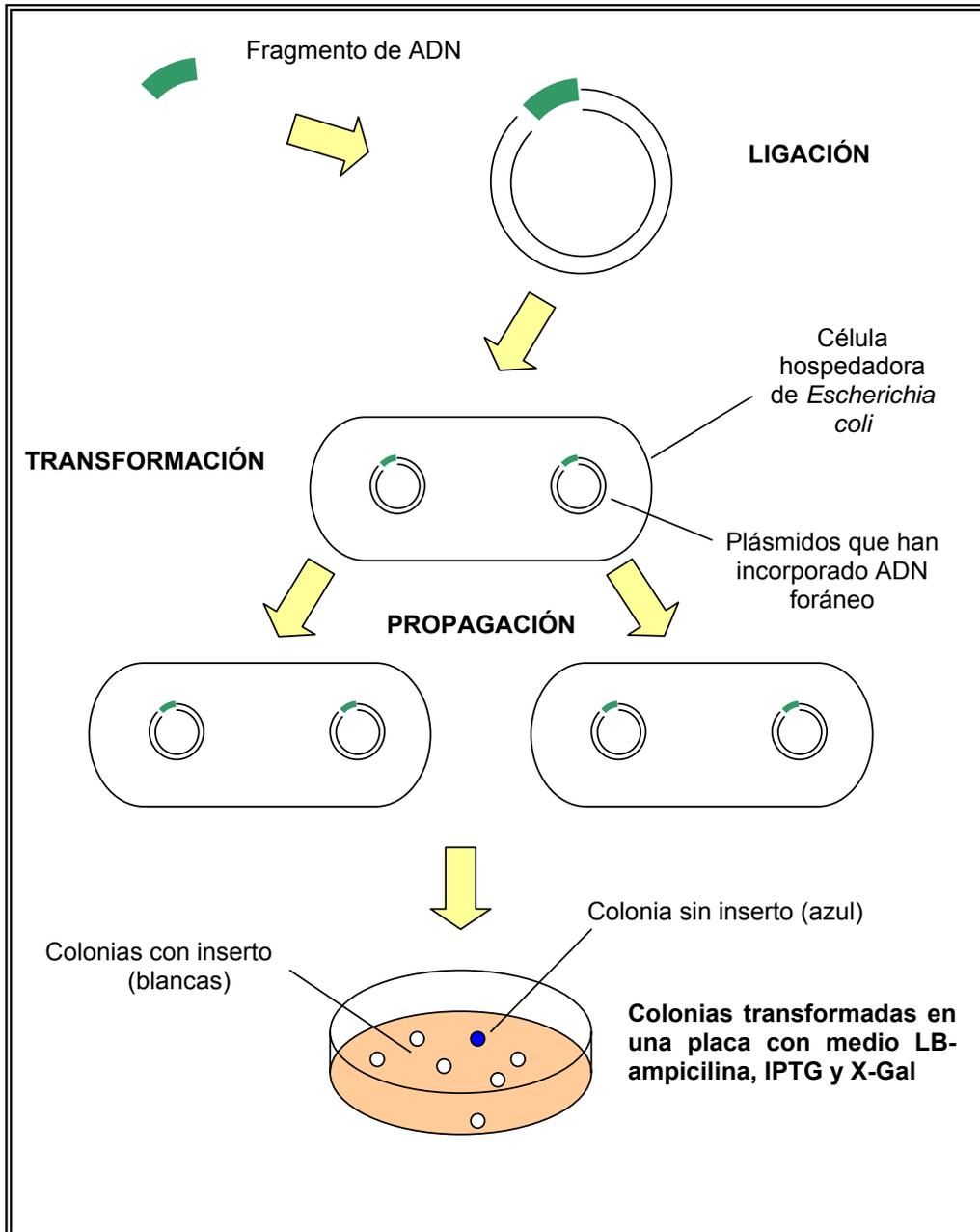


Figura 28. Esquema de la clonación de productos de PCR.

A continuación se describen detalladamente los pasos seguidos para la clonación de los dos fragmentos de ADN del gen 5S ADNr de oca y pato, y de los cuatro fragmentos del gen de la α -actina de oca, pato, pollo y cerdo.

III.2.7.2.1. Ligación de los productos de PCR

Antes de realizar la ligación en el vector *pGEM[®]-T Easy* de los productos de PCR seleccionados, fue preciso conocer su concentración. Para calcular la concentración de los productos de PCR purificados que había que incluir en la reacción de ligación, se utilizó la siguiente ecuación, teniendo en cuenta que el tamaño del vector es de 3,0 Kb, que se emplean 50 ng de vector y que la relación molar inserto/vector debe ser de 3/1:

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng del vector} \times \text{Tamaño del inserto (Kb)}}{\text{Tamaño del vector (Kb)}} \times \text{Relación molar inserto/vector}$$

Según esta ecuación, para la reacción de ligación de los fragmentos del gen 5S ADNr de oca y pato, cuyo tamaño era de 237 y 246 pb, respectivamente, se necesitaron 12 ng de ADN de dichos productos de PCR purificados. De igual forma se calculó la cantidad de ADN necesaria para clonar los fragmentos de 985 pb de oca, 983 pb de pato y 1.000 pb de pollo del gen de la α -actina, que fue de 50 ng. La cantidad de ADN necesaria para clonar el fragmento de 707 pb de la α -actina de cerdo fue de 35 ng.

En todas las reacciones de ligación se incluyeron controles positivos (con un inserto de 542 pb suministrado por el fabricante) y controles negativos (sin inserto). Para realizar la reacción de ligación, los reactivos se mezclaron según se indica en la *Tabla 14*.

La X indica los μL de producto de PCR requeridos para la ligación de los ng de ADN necesarios. La concentración de dicho ADN se calculó utilizando el patrón de concentración de ADN *Mass Ruler* y el sistema de análisis de imágenes Geldoc

1000 UV, como se indica en la sección III.2.4. Una vez mezclados los reactivos de la reacción de ligación, los tubos se incubaron a 4°C durante toda la noche.

Tabla 14. Reactivos empleados en la reacción de ligación			
REACTIVOS	Producto de PCR (inserto)	Control positivo	Control negativo
Tampón de ligación 2x	5 µL	5 µL	5 µL
Vector pGEM®- T Easy (50 ng/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
Producto de PCR	X µL	-	-
Control con inserto (4 ng/µL)	-	2 µL	-
Enzima ADN ligasa T4 (5U/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
Agua bidestilada estéril	1 µL	1 µL	3 µL
Total	10 µl	10 µl	10 µl

III.2.7.2.2. Transformación de células competentes de *Escherichia coli*

Terminada la reacción de ligación, se procedió a la introducción del vector en una célula hospedadora para permitir su propagación, es decir, a la transformación de células competentes de *Escherichia coli* JM109 con el vector pGEM®-T Easy. Estas células poseen una eficiencia de transformación superior a 10⁸ ufc/µg, por lo que son muy adecuadas para transformar productos de ligación. Para la transformación se utilizaron los siguientes medios de cultivo y soluciones:

Medios de cultivo y soluciones empleadas

- Medio LB

Bacto®-triptona	10	g
Bacto®-extracto de levadura	5	g
NaCl	5	g
Agua bidestilada	1.000	mL

Esterilización en autoclave

El pH del medio de ajustó a 7,0 con NaOH 4 M.

- Medio LB con ampicilina

Se añadieron 15 g de agar a un litro de medio LB. El medio de cultivo se esterilizó en el autoclave, se dejó enfriar y, cuando estaba a unos 50°C, se añadió la ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL. Se vertieron 30-35 mL de medio en cada placa de petri de 85 mm de diámetro y éstas se dejaron gelificar a temperatura ambiente. Las placas se conservaron a 4°C hasta su uso.

- Medio LB con ampicilina/IPTG/X-Gal

A la superficie de las placas de medio LB/ampicilina se añadieron 100 µL de IPTG (100 mM) y 20 µL de X-Gal (50 mg/mL), se extendieron estos suplementos con un asa de Driglasky y se permitió su absorción a la placa durante 30 min a 37°C.

- Medio SOC

Bacto [®] - triptona	2	g
Bacto [®] - extracto de levadura	0,5	g
NaCl 1 M	1	mL
KCl 1M	0,25	mL
Mg ²⁺ 2M	1	mL
Glucosa 2M	1	mL

Primero se mezclaron la triptona, el extracto de levadura, el NaCl y el KCl con 97 mL de agua bidestilada estéril y se esterilizó la mezcla en el autoclave. Cuando el medio se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron el Mg²⁺ y la glucosa a una concentración final de 20 mM. Posteriormente, se enrasó hasta 100 mL, se filtró el medio a través de filtros de 0,2 µm y se ajustó el pH a 7,0.

Transformación de células competentes

Para la transformación de las células competentes se procedió según las instrucciones del fabricante:

- Se aplicó un pulso de centrifuga a los tubos que contenían las reacciones de ligación. De cada reacción de ligación se tomaron 2 µL, que se introdujeron en tubos de centrifuga de 1,5 mL.

- Se descongelaron en hielo las células competentes de *Escherichia coli* JM109 (mantenidas a -85°C), y se mezclaron suavemente.
- Lentamente, se transfirieron 50 μL de la suspensión celular a cada uno de los tubos que contenían reacción de ligación, se mezcló cuidadosamente el contenido de los tubos, y se mantuvieron en hielo durante 20 min.
- Posteriormente, los tubos se calentaron a 42°C durante 45-50 s, y se situaron en hielo inmediatamente durante 2 min.
- Tras la incubación en hielo, se añadieron a cada tubo 950 μL de medio SOC a temperatura ambiente.
- Los tubos se incubaron durante 1,5 h a 37°C en agitación a 1.500 rpm.
- Finalmente, cuando las células competentes se habían multiplicado en el medio SOC, se sembraron 100 μL , 50 μL y 20 μL de cada tubo en placas de LB/ampicilina/IPTG/X-Gal y por duplicado. Además, se sembraron 2 placas con 100 μL de control positivo y 2 placas con 100 μL de control negativo. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 h y posteriormente se mantuvieron 2 h a 4°C para mejorar la diferenciación entre las colonias azules (control negativo) y las blancas (clones transformados).

Tras la transformación, se contaron las colonias blancas y azules desarrolladas en las placas, con el fin de analizar la eficiencia del proceso. Después se escogieron 20 colonias blancas al azar de las diferentes placas y se sembraron en tubos eppendorf con 1 mL de medio LB/ampicilina para obtener suficiente cultivo de cada una de ellas. Tras un periodo de incubación de 12 h en agitación a 37°C , los cultivos se mantuvieron a 4°C hasta su empleo en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

III.2.7.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de las colonias transformadas

Cuando las células transformadas (colonias blancas que contenían el inserto) se multiplicaron en el medio líquido LB/ampicilina, se emplearon los cultivos en la reacción en cadena de la polimerasa utilizando los cebadores del vector, M13F y

M13R. Estos cebadores hibridan a una distancia de 105 pb en ambos extremos del punto de inserción del fragmento de ADN. De este modo, analizando el tamaño de los productos de PCR resultantes, es posible identificar aquellos clones que han insertado los fragmentos de ADN de interés.

Las secuencias de los cebadores empleados son las siguientes:

M13F: 5'- GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'
(17 nucleótidos, $T_m = 62,3^\circ\text{C}$)

M13R: 5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
(17 nucleótidos, $T_m = 60,3^\circ\text{C}$)

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μL con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs 200 μM , 2 U de ADN polimerasa, MgCl_2 2 mM, 2-10 μL de medio líquido (en el que había crecido cada clon), 20 pmol de cada uno de los cebadores y agua para síntesis de ADN.

Los ciclos de tiempo/temperatura empleados en la reacción en cadena de la polimerasa fueron los siguientes:

94°C 5 min	}	x 1 ciclo
92°C 2 min		
60°C 2 min	}	x 30 ciclos
72°C 2 min		

Una vez realizada la electroforesis según el apartado III.2.4 y tras verificar que los productos de PCR tenían un tamaño adecuado (pb correspondientes al producto de PCR insertado más pb correspondientes al vector), los fragmentos de ADN amplificados del gen 5S ADNr y α -actina se purificaron según se describe en el apartado III.2.7.1.

III.2.7.3. PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

Los plásmidos en los que se habían clonado el fragmento de 394 pb del gen 12S ARNr de pato amplificado con los cebadores 12SFW/12SREV y el fragmento de

428 pb del gen 12S ARNr de cerdo amplificado con los cebadores 12STAQMANFWM/12STAQMANREVM, se purificaron para ser utilizados como estándar en las reacciones de PCR cuantitativo.

La purificación de los plásmidos comenzó con la siembra en 5 mL de medio LB de una colonia de *Escherichia coli* transformada con el plásmido de interés según se describe en la sección III.2.7.2. y su incubación a 37°C durante 16 h. A continuación se purificó el ADN plasmídico utilizando el *kit* de extracción *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante:

- Los 5 mL de medio LB que contenían la colonia transformada, se centrifugaron 10 min a 15.000 x *g*. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en 250 µL de tampón P1 y se transfirió a un tubo de centrifuga. A continuación, se añadieron 250 µL de tampón P2 y se invirtió el tubo 4-6 veces para mezclar el contenido. Finalmente, se añadieron 350 µL de tampón N3 y se mezcló todo invirtiendo suavemente el tubo 4-6 veces.
- La mezcla se centrifugó durante 10 min a 15.000 x *g*, y el sobrenadante se transfirió a una columna *QIAprep* introducida en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó de nuevo durante 10 min a 15.000 x *g*.
- Una vez descartado el líquido de elución, se añadieron a la columna 0,5 mL de tampón PB y se centrifugó de nuevo durante 1 min a 15.000 x *g*.
- Posteriormente, la columna de purificación se lavó añadiendo 0,75 mL del tampón *PE* (suministrado con el *kit* de extracción) y se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm.
- Finalmente, la columna se introdujo en un tubo limpio y se eluyó el ADN de la matriz con 25 µL de agua miliQ estéril, mediante centrifugación a 15.000 x *g* durante 1 min.

III.2.7.4. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR PURIFICADOS

La secuenciación de los productos de PCR amplificados con las parejas de cebadores 5S1/5S2, Act2/Act4, 12SFW/12SREV, 12SFWM/12SSEQ y M13F/M13R y purificados como se describe en la sección III.2.7.1., se llevó a cabo en el Centro

de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. La secuenciación se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM modelo 377 (Perkin/Elmer) con el *kit* de secuenciación *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing* (Perkin/Elmer).

Los cebadores utilizados para la secuenciación de los diversos fragmentos de ADN fueron los siguientes:

- 12SFW/12SREV y 12SFWM/12SSEQ para el gen mitocondrial 12S ARNr.
- Act2/Act3/Act4 para el gen nuclear α -actina.
- 5S1/5S2 para el gen nuclear 5S ADNr.
- M13F y M13R para los productos de PCR amplificados con los cebadores 5S1/5S2 en las muestras de oca y pato, y los cebadores Act/Act4 en las muestras de oca, pato, pollo y cerdo, clonados en el vector *pGEM[®]-T Easy*.

El *kit* de secuenciación *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing* (Perkin/Elmer) consta de: tampón de reacción, $MgCl_2$, desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), enzima ADN polimerasa y didesoxiterminadores (ddATP*, ddTTP*, ddGTP* y ddCTP*), marcados cada uno de ellos con una diclororrodamina diferente (dR6G, dROX, dR110 y dTAMRA respectivamente). Las cuatro diclororrodaminas presentan distinta longitud de onda de máxima absorción, lo que permite incluirlas en la misma reacción de secuenciación. A esta premezcla se le añade el ADN (unos 50 ng) y el cebador (5 pmol). La temperatura de hibridación del cebador con el ADN diana (T_a) utilizada en la reacción de secuenciación ha de ser 5°C inferior a la T_a del cebador. La temperatura de elongación es de 60°C. Los productos de la reacción se analizaron en geles de poliacrilamida y se cuantificaron mediante fluorimetría. Cada base de la secuencia se corresponde con un pico del registro cromatográfico y, a su vez, con una banda de color.

III.2.8. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE ADN

Para analizar las secuencias nucleotídicas de los productos de PCR se utilizaron los siguientes programas y herramientas, incluidos en el paquete informático *Genetic Computer Group* (GCG), versión 9,0 (Universidad de Wisconsin, EEUU):

- **STRINGSEARCH** para buscar secuencias correspondientes a los genes 5S ADNr, α -actina y 12S ARNr en las bases de datos *Genbank* y *EMBL*.
- **SEQED** para editar dichas secuencias.
- **GAP** para localizar los cebadores a lo largo del producto de PCR amplificado y para comparar parejas de secuencias similares. Esta herramienta permite alinear dos secuencias, minimizando el número de huecos y maximizando el número de acoplamientos.
- **PILEUP** para alinear múltiples secuencias correspondientes al mismo gen en diversos individuos de la misma especie o de especies diferentes.
- **PRETTY** para obtener secuencias consenso a partir de secuencias alineadas previamente con el programa PILEUP.
- **MAP** para determinar los puntos de corte de enzimas de restricción en las secuencias de ADN y para traducir estas secuencias a aminoácidos. **MAPSORT** es una modificación de este programa que muestra el tamaño de los fragmentos esperados tras la digestión de una secuencia con una o varias enzimas de restricción.

III.2.9. TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL

Además de la técnica de PCR descrita para la identificación de distintas especies animales, en este trabajo se ha desarrollado un PCR cuantitativo en tiempo real para la detección cuantitativa de la presencia de *foie gras* de pato en *foie gras* de oca, tanto en productos frescos como sometidos a tratamiento térmico. Esta técnica se empleó también para cuantificar la presencia de cerdo en vaca, tanto en mezclas cárnicas frescas como tratadas térmicamente.

La técnica de PCR cuantitativo desarrollada en este trabajo emplea una sonda Taqman® (*Figura 12*), que es un oligonucleótido capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de PCR, y que contiene un fluorocromo emisor o “*reporter*” en su extremo 5’ y otro fluorocromo apagador de fluorescencia o “*quencher*” en su extremo 3’. En el curso de la PCR, la sonda se une a su secuencia diana cuando esta se encuentra presente en la reacción y, durante la extensión de la cadena, la actividad 5’ exonucleasa de la enzima Taq ADN

polimerasa provoca la liberación del "reporter" del extremo 5' de la sonda, que al separarse del "quencher" comienza a emitir fluorescencia. La acumulación de los productos de PCR se detecta monitorizando el aumento de fluorescencia por la liberación del "reporter". El proceso de hibridación y corte de la sonda no interfiere con la acumulación exponencial del producto. A medida que aumenta el número de copias del producto, aumenta el de moléculas de sonda que hibridan en su secuencia diana y cada "reporter" se separa de su respectiva sonda, por lo que la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de amplicón generado. Como la sonda sólo se corta si hibrida en la secuencia diana, la fluorescencia generada procede exclusivamente de la amplificación específica de productos de PCR.

A continuación se describen detalladamente todas las etapas desarrolladas en la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real.

III.2.9.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de referencia de este trabajo fueron hígados grasos (*foie gras*) enteros crudos, proporcionados por Martiko (Navarra) e identificados anatómicamente en nuestro laboratorio. Asimismo, se analizaron muestras crudas y pasteurizadas de *foie gras* entero de oca y pato mulard, proporcionadas por Antonio de Miguel (Madrid, España), muestras pasteurizadas de *foie gras* de primera categoría proporcionadas por IMPERIA *foie gras* (Gerona, España) y muestras de *foie gras* esterilizadas, que se adquirieron en supermercados *delicatessen* locales. En el muestreo se incluyeron muestras de *foie gras* de siete marcas comerciales diferentes.

Los hígados de pollo y cerdo, así como la carne de pavo, cerdo, vaca y oveja se adquirieron en mercados locales. Los muestras de cabra procedían del matadero de Leganés (Madrid).

Se analizaron las siguientes muestras: *foie gras* fresco de pato y oca (7 muestras de cada especie), *foie gras* pasteurizado de pato y oca (6 muestras de cada especie) y *foie gras* esterilizado de pato y oca (7 muestras de cada especie), hígados de pollo y cerdo (10 muestras de cada especie) y tejido muscular de pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra (10 muestras de cada especie). Asimismo, diez

muestras diferentes de pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra se sometieron a pasteurización a 65°C durante 30 min y otras se esterilizaron a 121°C durante 20 min.

Partiendo de *foie gras* fresco de oca y pato se prepararon mezclas binarias experimentales (hígado/hígado) de pato en oca. También se preparó una mezcla de *foie gras* pasteurizada, utilizando *foie gras* crudo de oca y *foie gras* pasteurizado comercial de pato. Finalmente, se preparó una mezcla binaria de *foie gras* esterilizada partiendo de *foie gras* crudo de oca y *foie gras* esterilizado comercial de pato. De cada mezcla binaria (hígado/hígado) se prepararon cuatro porcentajes diferentes (25, 10, 1 y 0,1%) de la especie diana en la mezcla. Asimismo, para comprobar la viabilidad del empleo del PCR cuantitativo en tiempo real en otras aplicaciones se preparó una mezcla binaria (músculo/músculo) de cerdo en vaca con tres porcentajes diferentes (5, 1 y 0,1%) de cerdo en la mezcla. Las mezclas se realizaron sobre una cantidad total de 100 g, empleando una picadora (Sunbeam Oster, Florida, EEUU). Una vez preparadas las mezclas binarias, se tomaron submuestras de 5 g de cada mezcla que se sometieron a un tratamiento térmico de esterilización (120°C durante 20 min).

III.2.9.2. EXTRACCIÓN DEL ADN

El ADN genómico de las muestras se extrajo siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.3.4. Una vez extraído el ADN, se determinó su calidad y concentración como se explica en la sección III.2.4.

III.2.9.3. DISEÑO DE CEBADORES Y SONDAS

III.2.9.3.1. Cuantificación de ADN de pato en mezclas binarias pato/oca

Utilizando el programa informático Primer Express® versión 2,0 (Applied Biosystems) se diseñaron dos reacciones de amplificación complementarias, a partir del alineamiento y la comparación de las secuencias obtenidas en el gen 12S ARNr de oca (AJ583550), pato mulard (AJ583548) y cerdo (AJ583551) con otras secuencias disponibles en la base de datos EMBL de pato (U59666), pollo (X52392), pavo (U83741), cerdo (AJ002189), vaca (J01394), oveja (NC_001941) y cabra (M55541). Ambas reacciones emplean el mismo cebador directo

(12STAQMANFW) y la misma sonda (12SSONDA) pero distinto cebador inverso, que es el que confiere la especificidad a cada sistema.

- a) La primera reacción se diseñó con el objetivo de amplificar específicamente un fragmento de 96 pb en el ADN de pato, empleando un cebador inverso específico de pato (12STAQMANT) y el cebador directo 12STAQMANFW, diseñado para hibridar tanto en el pato como en la oca.
- b) La segunda reacción se diseñó con el fin de amplificar un fragmento de 120 pb tanto en el ADN de pato como en el de oca, pero no en otras especies animales como pollo, pavo, vaca, oveja, cabra y cerdo. Para ello se diseñaron los cebadores 12STAQMANFW como cebador directo y 12STAQMANREV como cebador inverso. Esta segunda reacción se utilizó como control endógeno, con el fin de normalizar los valores obtenidos en la reacción anterior.

En ambas reacciones se utilizó la misma sonda Taqman® (12SSONDA), marcada en el extremo 5' con el fluorocromo FAM™ y en el extremo 3' con el "quencher" TAMRA™.

Las secuencias de los cebadores y de la sonda empleados se muestran en la *Tabla 15*.

Tabla 15. Secuencias de los cebadores y de la sonda utilizados			
NOMBRE	SECUENCIA (5' - 3')	SISTEMA	TAMAÑO AMPLICÓN
12STAQMANFW	AAGCCGGCCCTAGGGC	CONTROL ENDÓGENO PATO+OCA	120 pb
12STAQMANREV	TCCGGTACACTTACCTTGTTACGACTT		
12SSONDA	ATACCGCCCGTCACCCTCCTCAIAAG		
12STAQMANFW	AAGCCGGCCCTAGGGC	ESPECÍFICO DE PATO	96 pb
12STAQMANT	TTACCTCATCTTTGGCATTACAG		
12SSONDA	ATACCGCCCGTCACCCTCCTCAIAAG		

III.2.9.3.2. Cuantificación de ADN de cerdo en mezclas binarias cerdo/vaca

Utilizando el programa informático Primer Express® (Applied Biosystems) y comparando las secuencias obtenidas en el gen 12S ARNr citadas en el apartado III.2.9.3.1, se diseñaron dos reacciones de amplificación complementarias para la cuantificación de ADN de cerdo en mezclas binarias. Ambas reacciones emplean el mismo cebador directo (12STAQMANFWM) y la misma sonda (12SSONDAMAMIF), mientras que el cebador inverso es el que confiere diferente especificidad a cada sistema.

- a) La primera reacción se diseñó con el objetivo de amplificar específicamente un fragmento de 411 pb en el ADN de cerdo, empleando un cebador inverso específico de cerdo (12STAQMANS) y el cebador directo 12STAQMANFWM que hibrida en las secuencias de ADN de cerdo, vaca, oveja y cabra. Debido a la especificidad del cebador 12STAQMANS, en esta reacción no se debe amplificar el ADN procedente de otras especies de mamíferos como vaca, oveja y cabra ni el de aves como pollo, pato, pavo u oca.
- b) La segunda reacción se diseñó para amplificar un fragmento de 425-428 pb en los ADNs de cerdo, vaca, oveja y cabra. Para ello se emplearon los cebadores 12STAQMANFWM como cebador directo y 12STAQMANREVM como cebador inverso. Esta segunda reacción se utilizó como control endógeno, con el fin de normalizar los valores obtenidos en la reacción anterior.

En ambas reacciones se empleó la misma sonda Taqman® (12SSONDAMAMIF), marcada en el extremo 5' con el fluorocromo FAM™ y en el extremo 3' con el "quencher" TAMRA™.

Las secuencias de los cebadores y de la sonda empleados se muestran en la *Tabla 16*.

III.2.9.4. AMPLIFICACIÓN POR PCR

III.2.9.4.1. Cuantificación de ADN de pato en mezclas binarias pato/oca

Para la cuantificación de pato en *foie gras* de oca, el ADN extraído de las muestras se amplificó empleando los cebadores 12STAQMANFW-12STAQMANREV y 12STAQMANFW-12STAQMAMD cuyas secuencias se describen en la sección

III.2.9.3 y que delimitan fragmentos de 120 y 96 pb del gen 12S ARNr, respectivamente.

Tabla 16. Secuencias de los cebadores y de la sonda utilizados			
NOMBRE	SECUENCIA (5' - 3')	SISTEMA	TAMAÑO AMPLICÓN
12STAQMANFWM	AAAGGACTTGGCGGTGCTT	CONTROL ENDÓGENO MAMÍFEROS	425-428 pb
12STAQMANREVM	TCCAGTATGCTTACCTTGTTACGA CTT		
12SSONDAMAMIF	TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGA TAAACCCCG		
12STAQMANFWM	AAAGGACTTGGCGGTGCTT	ESPECÍFICO DE CERDO	411 pb
12STAQMANS	GTTACGACTTGTCTCTTCGTGCA		
12SSONDAMAMIF	TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGA TAAACCCCG		

En primer lugar, fue preciso optimizar las concentraciones de la sonda y de los cebadores empleados. Para ello, se evaluaron diferentes concentraciones de los cebadores y de la sonda para valorar el efecto producido en los valores de fluorescencia final y C_t obtenidos. Las concentraciones más eficientes, aquellas que produjeron la fluorescencia final más elevada y el C_t más bajo, fueron 50 nM de cebador directo (12STAQMANFW), 900 nM de cebador inverso (12STAQMANREV o 12STAQMANS), 150 nM de sonda (12SSONDA) y 10 ng de ADN, conjuntamente con una solución de PCR "Taqman PCR Master Mix" (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 25 μ L en una placa de 96 pocillos "Microamp® Optical/96-well Reaction Plate" (Applied Biosystems) cubierta con una lámina óptica adhesiva.

La reacción de PCR cuantitativo en tiempo real se realizó empleando el equipo SDS 7700 (Applied Biosystems) con el siguiente programa:

50°C	2	min	}	x 1 ciclo
95°C	10	min		
95°C	15	s.	}	x 40 ciclos
60°C	1	min		

Se empleó el mismo programa de ciclos de tiempo/temperatura en las dos reacciones de amplificación (específica de pato y control endógeno de pato+oca).

III.2.9.4.2. Cuantificación de ADN de cerdo en mezclas binarias cerdo/vaca

Para la cuantificación de cerdo en mezclas binarias con vaca, el ADN extraído de las muestras, se amplificó empleando los cebadores *12STAQMANFWM-12STAQMANREVM* y *12STAQMANFWM-12STAQMANS* cuyas secuencias se describen en la sección III.2.9.3 y que delimitan fragmentos de aproximadamente 428 y 411 pb del gen 12S ARNr, respectivamente.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 25 μ L en una placa de 96 pocillos "Microamp® Optical/96-well Reaction Plate" cubierta con una lámina óptica adhesiva. En cada reacción además de una solución de PCR "Taqman PCR Master Mix", se añadieron 300 nM de cebador directo (*12STAQMANFWM*), 900 nM de cebador inverso (*12STAQMANREVM* o *12STAQMANS*), 200 nM de sonda (*12SSONDAMAMIF*) y 10 ng de ADN.

Los ciclos de tiempo/temperatura programados en el equipo SDS 7700 fueron los mismos indicados en la sección III.2.9.4.1 para la cuantificación de ADN de pato.

III.2.9.5. PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO PARA LA ELABORACIÓN DE LA RECTA ESTÁNDAR

III.2.9.5.1. Cuantificación de ADN de pato en mezclas binarias pato/oca

El cebador directo, 12SFW (5'-CCACCTAGAGGAGCCTGTTCT(AG)TAAT-3') y el inverso, 12SREV (5'-TCCGGTACACTTACCTTGTTACGACTT-3'), se diseñaron a partir de la comparación de las secuencias del gen 12S ARNr disponibles en la base de datos Genbank para pato, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra (Números de acceso U59666, X52392, U83741, AJ002189, J01394, NC_001941, M55541, respectivamente) para amplificar un fragmento de 394 pb en el ADN de

pato mulard en el gen 12S ARNr. El fragmento específico de pato se amplificó empleando un volumen de reacción de 50 μ L. Cada reacción contenía 150-200 ng de ADN, MgCl₂ 2 mM, 5 pmol de cada cebador, 200 μ M de cada dNTP y 2U de ADN polimerasa *Tth* (Biotools, Madrid, España) en un tampón compuesto por Tris-HCl 75 mM, pH 9,0; MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂ SO₄ 20 mM y 0,001% BSA.

Las condiciones de los ciclos de tiempo y temperatura fueron las siguientes:

93°C	2 min	}	x 1 ciclo
93°C	30 s		
60°C	30 s	}	x 35 ciclos
72°C	45 s		
72°C	5 min	}	x 1 ciclo

Posteriormente se purificó el producto de PCR, siguiendo el protocolo descrito en la sección III.2.7.1. y, finalmente se ligó al plásmido *pGEM®-T Easy*, ®usando el kit comercial *pGEM®-T Easy Vector System II* (Promega), utilizando el protocolo descrito en la sección III.2.7.2. El plásmido se purificó mediante el protocolo de la sección III.2.7.3.

Para realizar la recta estándar en el ensayo de PCR cuantitativo en tiempo real, tanto en el sistema específico de pato como en el control endógeno de pato+oca, se utilizaron diluciones decimales seriadas de este plásmido comenzando por 100 ng de ADN.

III.2.9.5.2. Cuantificación de ADN de cerdo en mezclas binarias cerdo/vaca

El cebador directo *12STAQMANFWM* (5'-AAAGGACTTGGCGGTGCTT-3') y el inverso, *12STAQMANREVM* (5'-TCCAGTATGCTTACCTTGTTACGACTT-3'), se diseñaron a partir de la comparación de las secuencias del gen 12S ARNr disponibles en la base de datos Genbank para pato, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra (Números de acceso U59666, X52392, U83741, AJ002189, J01394, NC_001941, M55541, respectivamente) para amplificar un fragmento de 428 pb en el ADN de cerdo en el gen 12S ARNr. Las condiciones de la reacción de amplificación de PCR y los ciclos de tiempo y temperatura fueron los mismos que en el apartado III.2.9.5.1.

Posteriormente se purificó el producto de PCR, siguiendo el protocolo descrito en la sección III.2.7.1. y, finalmente se ligó al plásmido *pGEM[®]-T Easy*, usando el *kit* comercial *pGEM[®]-T Easy Vector System II* (Promega), utilizando el protocolo descrito en la sección III.2.7.2. El plásmido se purificó siguiendo el protocolo de la sección III.2.7.3.

Para realizar la recta estándar en el ensayo de PCR cuantitativo, tanto en el sistema específico de cerdo como en el control endógeno de mamíferos, se utilizaron diluciones decimales seriadas de este plásmido comenzando por 100 ng de ADN.

III.2.9.6. ANÁLISIS DE LOS DATOS

III.2.9.6.1. Cuantificación de ADN de pato en mezclas binarias pato/oca

Durante la amplificación de un ensayo de PCR cuantitativo en tiempo real, el programa informático del ordenador del sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700, versión 1,7 (Applied Biosystems) analiza los datos calculando la contribución de cada componente fluorescente al experimento.

En los ciclos iniciales de la PCR, apenas hay cambios en la señal de fluorescencia (ΔR_n). Esta zona define la línea basal del gráfico de amplificación. La línea umbral indica el nivel de fluorescencia a partir del cual se comienza a detectar producto de PCR acumulado. Esta línea debe situarse por encima de la línea basal y dentro de la zona en la que se produce la fase exponencial de la reacción (que es lineal en la transformación logarítmica del gráfico). El umbral se calcula como 10 veces la desviación estándar de la emisión media de la línea basal entre los ciclos 3 y 15. En este trabajo, el umbral se situó en 0,03 de fluorescencia. El C_t (ciclo umbral o *threshold cycle*) se define como la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la línea umbral.

La cantidad de ADN de pato en una muestra problema se mide interpolando el C_t obtenido por la misma en una recta estándar, cuyos C_t se han obtenido a partir de unas concentraciones de ADN conocidas (ADN plasmídico de pato). La comparación del número de ciclo en el cual se detectan por primera vez los productos de PCR específico de pato y endógeno en combinación con el empleo de estándares de concentraciones de ADN de pato conocidas (C_t s) se utilizó para

determinar el porcentaje de *foie gras* de pato en una muestra. La cantidad de ADN total en las mezclas de *foie gras* pato/oca se determinó mediante el valor de C_t en el sistema de control endógeno pato+oca ($C_{t,d+g}$), y la cantidad de ADN de pato en esas mezclas se determinó mediante el valor del C_t obtenido en el sistema específico de pato ($C_{t,d}$). De esta manera, el C_t correspondiente al porcentaje de ADN de pato mulard en una muestra problema ($C_{t,ps}$), se determinó como la relación existente entre los ciclos umbrales de los sistemas específico y endógeno con la siguiente fórmula:

$$C_{t,ps} = C_{t,s} * C_{t,d} / C_{t,d+g}$$

donde: $C_{t,s}$, valor medio del ciclo umbral del estándar (ADN plasmídico de pato) utilizando 10 ng de ADN en el sistema de control endógeno pato+oca; $C_{t,d}$, valor medio del ciclo umbral de la muestra problema analizada con el sistema de PCR específico de pato; $C_{t,d+g}$, valor medio del ciclo umbral de la muestra problema analizada con el sistema de control endógeno pato+oca; y $C_{t,ps}$, valor del ciclo umbral que corresponde al porcentaje de ADN de pato mulard en la muestra problema.

Además, la correlación entre las variables, ciclo umbral (C_t) y concentración de pato ($[C]$) es semilogarítmica.

$$C_t = b \ln [C] + a \quad \text{donde } b \text{ es la pendiente y } a \text{ es la ordenada en el origen.}$$

La linealidad del modelo se verificó mediante análisis de la varianza (ANOVA): el valor “ F ” representa estadísticamente la regresión, el coeficiente de correlación “ r ” representa estadísticamente la correlación entre los resultados obtenidos en el test (valores de C_t) y la concentración de pato en las mezclas, mientras que el coeficiente de determinación “ r^2 ” expresa cuantitativamente esa correlación.

Para estudiar la sensibilidad del método de PCR cuantitativo en tiempo real, se evaluaron los siguientes parámetros (Camacho y col., 1993):

- El *test de Cochran* que determina si las varianzas de las respuestas obtenidas para cada concentración de pato en las mezclas son homogéneas, con un nivel de probabilidad del 95%.

- La *sensibilidad de calibrado* que corresponde a la pendiente de la recta (al ser un modelo lineal).
- La *sensibilidad analítica*, que es la relación que existe entre la posibilidad de obtener un resultado por azar, y que las modificaciones obtenidas sean debidas a las diferencias de concentración de cada mezcla, y se calcula como un cociente entre la sensibilidad de calibrado y la media de las desviaciones estándares para todas las concentraciones.
- y la *capacidad de discriminación* que corresponde a la inversa de la sensibilidad analítica multiplicada por un valor del estadístico *t* de Student con una probabilidad del 95% y tantos grados de libertad como muestras tenga el experimento, y representa la mínima diferencia de concentración de ADN de pato en la mezcla que se puede cuantificar con el método analítico, para un nivel de probabilidad del 95%.

La sensibilidad analítica y la capacidad de discriminación se calculan a partir de la media de las varianzas de las respuestas " S^2_{comb} ".

$$S^2_{comb} = (\sum(\varphi_i * S_i^2)) / (\sum \varphi_i)$$

donde: S_i^2 es la varianza de las respuestas de cada concentración de la mezcla "i"; y φ_i son los grados de libertad de esas respuestas.

Para llevar a cabo la validación de la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real desarrollada en este trabajo, se realizaron 3 extracciones separadas de cada porcentaje de ADN de pato en las mezclas de *foie gras* de pato/oca (25, 10, 1 y 0,1%). Las muestras se analizaron cuatro días diferentes, utilizando dos replicados de cada muestra. Los parámetros estadísticos se evaluaron con el programa informático Statgraphics Plus versión 5,0.

III.2.9.6.2. Cuantificación de ADN de cerdo en mezclas binarias cerdo/vaca

Para medir la cantidad de ADN en una muestra problema es preciso interpolar el C_t obtenido en la misma, en una recta estándar cuyos C_t se han obtenido a partir de unas concentraciones de ADN conocidas (ADN plasmídico de cerdo). La comparación del número de ciclo en el cual se detectan por primera vez los productos de PCR específico de cerdo y endógeno, en combinación con el empleo

de estándares de concentraciones de ADN de cerdo conocidas (C_{ts}), se utilizó para determinar el porcentaje de cerdo en una muestra. La cantidad de ADN total en las mezclas de tejido muscular de cerdo/vaca se determinó mediante el valor de C_t en el sistema de control endógeno de mamíferos (C_{tm}), y la cantidad de ADN de cerdo en esas mezclas se determinó mediante el valor del C_t obtenido en el sistema específico de cerdo (C_{tc}). De esta manera, el C_t correspondiente al porcentaje de ADN de cerdo en una muestra problema (C_{tps}), se determinó como la relación existente entre los ciclos umbrales de los sistemas específico y control endógeno con la siguiente fórmula:

$$C_{tps} = C_{ts} * C_{tc} / C_{tm}$$

donde: C_{ts} , valor medio del ciclo umbral del estándar (ADN plasmídico de cerdo) utilizando 10 ng de ADN en el sistema de control endógeno de mamíferos; C_{tc} , valor medio del ciclo umbral de la muestra problema analizada con el sistema de PCR específico de cerdo; C_{tm} , valor medio del ciclo umbral de la muestra problema analizada con el sistema de PCR endógeno de mamíferos; y C_{tps} , valor del ciclo umbral que corresponde al porcentaje de ADN de cerdo en la muestra problema.

Además, la correlación entre las variables, ciclo umbral (C_t) y concentración ($[]$) es semilogarítmica.

$$C_t = b \ln [] + a \quad \text{donde } b \text{ es la pendiente y } a \text{ es la ordenada en el origen.}$$

Se evaluaron los mismos parámetros de linealidad y sensibilidad que en el apartado III.2.9.6.1.

Para llevar a cabo la validación de la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real desarrollada en este trabajo, se realizaron 3 extracciones separadas de cada porcentaje de ADN de cerdo en las mezclas de tejido muscular de cerdo/vaca (5, 1 y 0,5%). Las muestras se analizaron cuatro días diferentes, utilizando dos replicados de cada muestra.

III.3. METODOLOGÍA UTILIZADA PARA EL DESARROLLO DE LAS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

La diferenciación de oca y pato mulard se abordó también mediante el empleo de anticuerpos policlonales y de técnicas inmunoenzimáticas de ELISA. Asimismo, se

trataron de obtener anticuerpos recombinantes para llevar a cabo dicha diferenciación.

III.3.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS

Para la extracción de las proteínas solubles de oca se partió de una mezcla de *foie gras* fresco de 3 individuos distintos. 15 g de dicha mezcla se homogeneizaron en 50 mL de solución salina (8,5 g/L de NaCl). Los homogeneizados se centrifugaron a 80.000 x g durante 30 min a 15°C. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron a través de filtros de vidrio borosilicatados (diámetro del poro 40-90 µm), empleando para ello un aspirador de vacío. Finalmente, el filtrado se liofilizó y se almacenó en envases herméticos en refrigeración a 4°C hasta su posterior utilización. Asimismo se prepararon extractos antigénicos a partir de muestras de *foie gras* pasteurizadas de oca siguiendo un procedimiento similar.

La extracción de proteínas solubles de *foie gras* fresco y pasteurizado de pato se realizó de forma análoga.

La determinación del contenido proteico de los extractos antigénicos de oca y pato, se llevó a cabo utilizando el ensayo de determinación de proteína *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad).

III.3.2. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Los anticuerpos policlonales se encuentran en el suero de los animales de laboratorio sometidos a la exposición continuada a un antígeno. Constituyen una mezcla heterogénea de anticuerpos procedentes de muchos clones de linfocitos B, que reaccionan frente a distintos determinantes antigénicos. La afinidad y especificidad de estos anticuerpos varía según los lotes empleados en la inmunización y, por lo general, es preciso purificar los inmunosueros antes de su utilización en los inmunoensayos.

A continuación se describe la pauta de inmunización de los conejos por inoculación de los extractos antigénicos de oca y pato. Una vez realizada la sangría final, los inmunosueros obtenidos se purificaron parcialmente mediante precipitación con sulfato amónico al 50%. Finalmente, se procedió a la neutralización selectiva de los anticuerpos purificados utilizando la técnica de inmunoadsorción.

III.3.2.1. PAUTA DE INMUNIZACIÓN Y OBTENCIÓN DE INMUNOSUEROS

Para la producción de los inmunosueros se emplearon 4 lotes de 2 conejos macho de la raza *Nueva Zelanda* de 3-3,5 Kg de peso. Al primer lote se le inoculó el extracto antigénico de *foie gras* fresco de oca y al segundo, el extracto antigénico de *foie gras* pasteurizado de oca. El tercer y cuarto lote de animales se inmunizó con los extractos antigénicos de *foie gras* fresco y pasteurizado de pato, respectivamente.

La inmunización de cada lote comenzó con la inoculación intradérmica, en varios puntos de la espalda del animal, del extracto antigénico correspondiente (1 mg de proteína) emulsionado en 0,5 mL de Adyuvante Completo de Freund y 0,5 mL de solución salina estéril (NaCl al 0,85%). Las inoculaciones se sucedieron durante 4 meses a intervalos de 1-2 semanas, utilizando el Adyuvante Incompleto de Freund, en lugar del Completo, e inoculando intramuscularmente, a partir de la segunda inoculación.

Antes de la primera inoculación de los extractos antigénicos, se realizó una sangría inicial (S_0) para comprobar la ausencia de reactividad de los sueros de los animales frente a los antígenos estudiados.

A los 20, 41, 62, 97 y 122 días de la primera inoculación, se realizaron sangrías parciales de la vena marginal de la oreja, con el fin de verificar la eficacia del proceso de inmunización. La presencia de anticuerpos frente a oca y pato mulard en el suero procedente de las sangrías parciales, se comprobó mediante la técnica de ELISA indirecto en placa descrita más adelante (apartado III.3.3.1).

La sangría final (S_f) de los animales se efectuó transcurridos 130 días del comienzo del proceso de inmunización, una vez comprobado, mediante la técnica de ELISA indirecto en placa, que el título de los inmunosueros era adecuado.

Para realizar la sangría final, los conejos se anestesiaron inyectándoles pentobarbital sódico (35 mg/Kg de peso) por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja. A continuación, se colocaron sobre una mesa en posición de *decúbito supino*, inmovilizándoles las cuatro extremidades y, seguidamente, se les introdujo una aguja (18G) entre el cuarto y el quinto espacio intercostal de la región torácica.

Cuando la aguja alcanzó la posición intracardiaca, la sangre del conejo se recogió en tubos de vidrio hasta el desangrado completo del animal.

La sangre extraída de los conejos se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente para facilitar la formación de coágulo. A continuación, para favorecer la retracción del coágulo, se separó este cuidadosamente de las paredes de los tubos con ayuda de una espátula y se incubaron los tubos a 4°C durante 15 horas. El suero se trasvasó a tubos de centrifuga y se centrifugó durante 10 min a 2.000 g a una temperatura de 4°C.

Al sobrenadante obtenido se le añadió azida sódica al 0,01% y, a continuación se distribuyó en alícuotas que se conservaron en viales de vidrio en congelación a -20°C hasta el momento de su utilización.

Los inmunosueros obtenidos frente a las proteínas solubles de oca y pato mulard, se purificaron parcialmente mediante precipitación selectiva con sulfato amónico al 50%. Esta técnica es una de las más utilizadas para la separación de las proteínas de una solución acuosa. Las proteínas solubles forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua a través de sus grupos polares. Cuando se añaden concentraciones elevadas de iones fuertemente cargados como el amonio y el sulfato, éstos compiten con las moléculas proteicas en su unión por el agua. La solubilidad de las proteínas disminuye al perder su unión con las moléculas de agua y esto origina su precipitación.

La precipitación de las inmunoglobulinas de los sueros anti-oca y anti-pato se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Harlow y Lane (1999):

- 5 mL de inmunosuero se centrifugaron a 3.000 g durante 30 min.
- Se recogió el sobrenadante y se le añadieron, gota a gota y agitando al mismo tiempo, 5 mL de una solución saturada de sulfato amónico 4,1 M, pH 7,4. A continuación, la mezcla se mantuvo en reposo durante 15 h a 4°C para permitir la precipitación de las inmunoglobulinas.
- Tras la precipitación, la mezcla se centrifugó a 3.000 g durante 30 min y se descartó el sobrenadante.

- Las inmunoglobulinas presentes en el sedimento se resuspendieron en 2,5 mL de tampón fosfato salino (PBS: NaCl 0,14 M; KH₂PO₄ 0,0015 M; Na₂HPO₄·12H₂O 0,081 M; KCl 0,0027 M; pH 7,2) y, a continuación, se dializaron en tampón PBS durante 24 h a 4°C. En la diálisis se utilizaron membranas tubulares Serva mod. 27/32.
- Una vez dializadas las muestras, las inmunoglobulinas anti-oca y anti-pato se distribuyeron en alícuotas de 0,5 mL y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

Tras la purificación parcial de los anticuerpos se procedió a su neutralización selectiva utilizando la técnica de inmunoadsorción (Jones y Patterson, 1986). Para ello, cada inmunosuero (anti-oca y anti-pato) diluido 1:2.000 en PBSTM (tampón PBS con un 1% de Tween 20 y un 1% de leche en polvo desnatada), se mezcló con 0,5 mg/mL del extracto antigénico liofilizado de la especie heteróloga. Las mezclas de cada inmunosuero con el extracto antigénico heterólogo se incubaron durante 1 h a 37°C y, a continuación, se utilizaron en la técnica de ELISA indirecto.

III.3.3. TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN PLACA

En esta técnica, los antígenos de la muestra se fijan por adsorción pasiva a los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos. A continuación se incorporan los anticuerpos específicos que, al reconocer al antígeno, quedan unidos a él. Después de un lavado que elimina las moléculas que no han reaccionado, los anticuerpos unidos al antígeno se detectan por un segundo anticuerpo marcado con una enzima, que reconoce como antígenos a los anticuerpos específicos. Se lava de nuevo la placa y se añade a continuación el sustrato de la enzima. La reacción se visualiza por la liberación de un compuesto coloreado al actuar la enzima sobre un sustrato adecuado. La intensidad de color que se produce en la reacción es proporcional a la concentración del antígeno de la muestra (*Figura 8*).

Tampones y reactivos

- Tampón PBS (pH 7,2)

NaCl	8,0 g (0,14 M)
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,9 g (8,1 mM)

KH ₂ PO ₄	0,2 g (1,5 mM)
KCl	0,2 g (2,7 mM)
Agua destilada	1 L

- Tampón PBST

Tampón PBS con un 1% de Tween 20.

- Tampón PBSTM

Tampón PBST con un 1% de leche desnatada en polvo.

- Solución de bloqueo

Albumina sérica bovina (BSA) al 1% en tampón PBS.

- Sustrato

Solución comercial de 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) (Roche).

- Solución de frenado

H₂SO₄ 1M.

Antígenos

Las muestras de *foie gras* utilizadas como antígenos en la técnica de ELISA indirecto en placa se prepararon como se describe en la sección III.3.1.

Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos anti-oca (anti-proteínas solubles de oca) y anti-pato (anti-proteínas solubles de pato), parcialmente purificados mediante precipitación con sulfato amónico y neutralizados selectivamente con el extracto antigénico de la especie heteróloga. También se emplearon anticuerpos anti-oca y anti-pato precipitados con sulfato amónico y sin neutralizar.

Conjugado

Se empleó un conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de conejo obtenidas en cerdo, marcadas con la enzima peroxidasa de rábano (Dako). El conjugado se utilizó diluido 1:2.000 en tampón PBSTM.

Metodología del ELISA indirecto en placa

Los pocillos de una placa de ELISA (Nunc) se sensibilizaron con 100 μL del antígeno correspondiente, diluido 1:50 en tampón PBS. La placa se incubó durante 1 h a 37°C, tras lo cual se lavó 5 veces con tampón PBST. A continuación, se añadieron 200 μL de solución de bloqueo a cada pocillo para cubrir las zonas del mismo en las que no se hubiera adsorbido el antígeno. La placa se mantuvo 30 min a 37°C y, posteriormente, los pocillos se lavaron 5 veces con tampón PBST para eliminar el exceso de solución de bloqueo. Una vez lavada la placa, se añadieron a cada pocillo 100 μL de los anticuerpos diluidos en PBSTM. La placa se incubó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron 5 veces con tampón PBST para eliminar aquellos anticuerpos que no hubiesen reaccionado. A continuación, se depositaron en cada pocillo 100 μL del conjugado diluido en tampón PBSTM. La placa se mantuvo en un agitador de placas de ELISA durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar los pocillos 5 veces con agua destilada para eliminar los restos de conjugado libre, se añadieron a cada pocillo 100 μL del sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina. Después de 10 min de incubación, la reacción se paró con 50 μL de solución de frenado.

El color azul resultante de la degradación del sustrato por la enzima vira a amarillo tras parar la reacción con ácido sulfúrico. La intensidad de la reacción se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 450 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

III.3.4. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Para la obtención de anticuerpos recombinantes se ha empleado una genoteca sintética de anticuerpos humanos, conocida como genoteca Griffin, que contiene $1,2 \times 10^9$ clones de *Escherichia coli* transformados con fagémidos que codifican distintas combinaciones de regiones variables de cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos unidas por un péptido en forma de scFv (*Figura 29*). La genoteca se había construido clonando las regiones variables de los anticuerpos humanos (scFv) en el vector fagémido pHen2 (*Figura 30*).

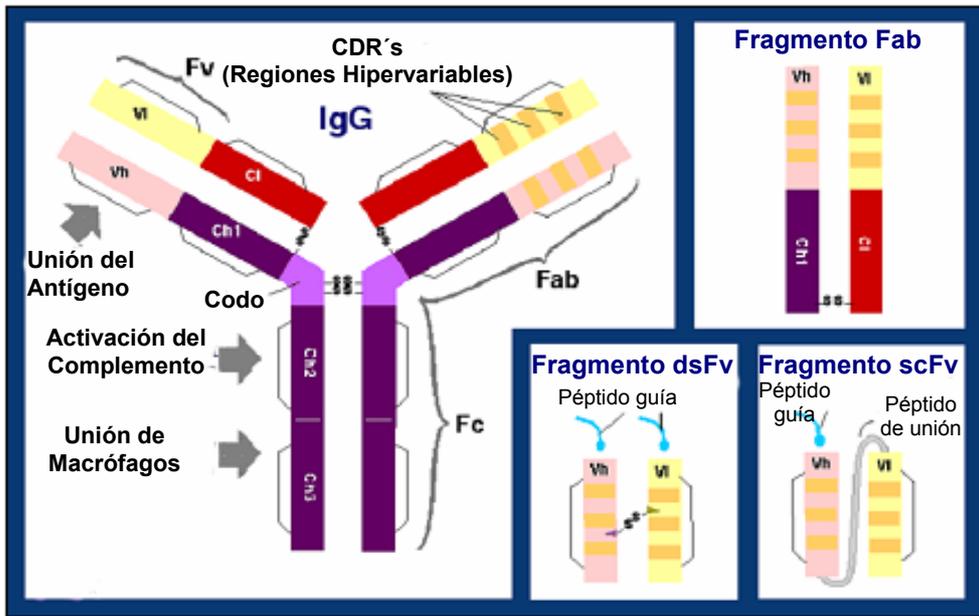


Figura 29. Dibujo esquemático de las regiones de una inmunoglobulina y de los distintos fragmentos que pueden emplearse para generar anticuerpos recombinantes (Fab, dsFv y scFv).

Los bacteriófagos se utilizan habitualmente como vectores de clonación en células de *Escherichia coli*, ya que contienen toda la información genética necesaria para completar el ciclo del fago, y además gracias a su pequeño tamaño (3-5 kb), presentan una eficiencia de transformación muy elevada (Gavilondo y Larrick, 2000). Actualmente, se están utilizando nuevos vectores de clonación llamados fagémidos, que combinan las ventajas de los fagos y de los plásmidos. Los fagémidos contienen el origen de replicación y la señal de empaquetamiento del fago filamentoso, y el origen de replicación y los sistemas de expresión génica del plásmido. Los fagémidos pueden mantenerse como los plásmidos en el interior de la bacteria dirigiendo la expresión de las proteínas deseadas, pero precisan de un fago ayudante para encapsularse.

El fagémido pHen2 deriva del bacteriófago filamentoso M13 y presenta, bajo la dirección del promotor LacZ, una zona que sirve de lugar de unión al ribosoma (RBS), seguida de las secuencias que codifican la síntesis de un péptido guía o

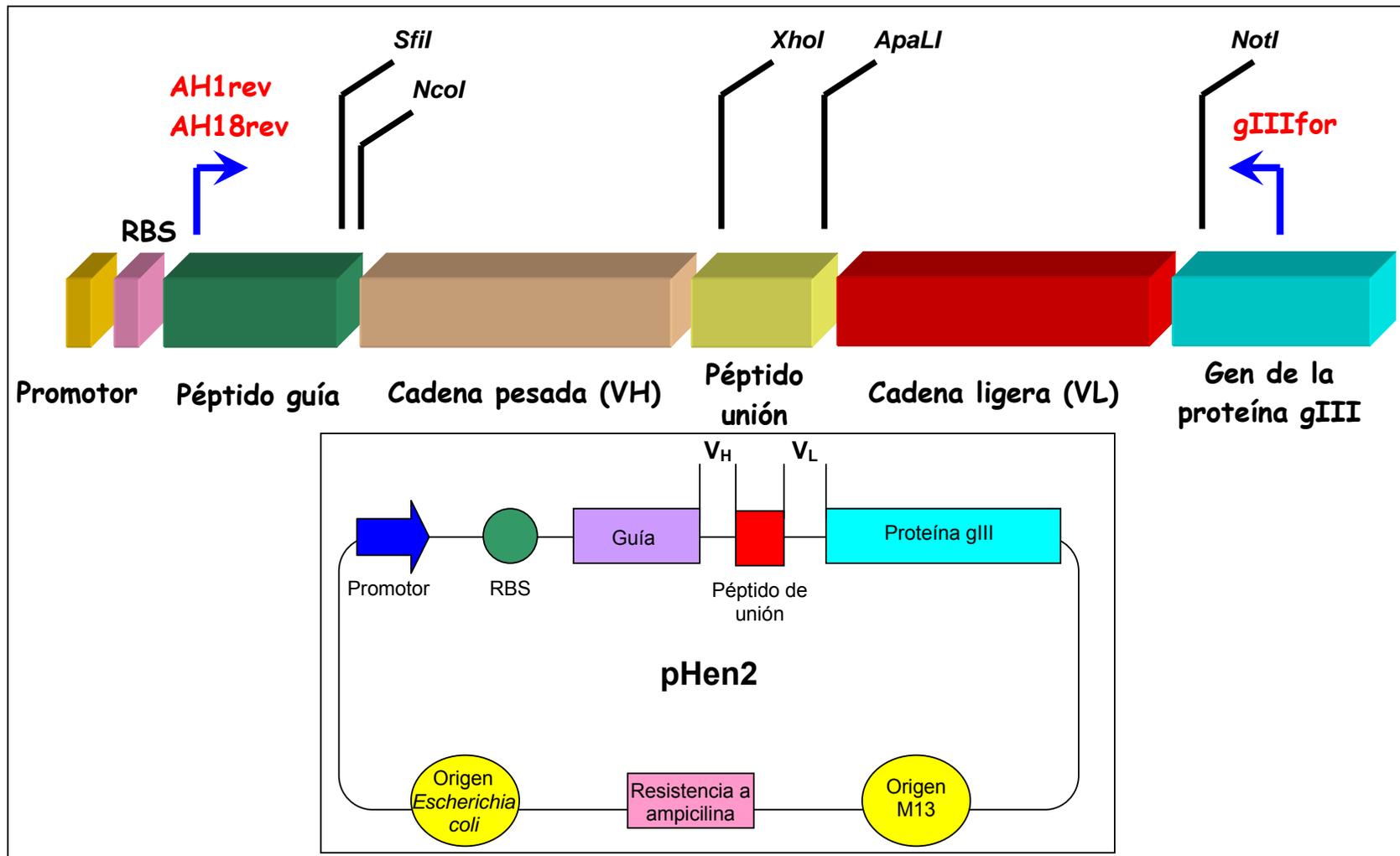


Figura 30. Representación esquemática del vector pHen2.

señal, las scFv y el gen de la proteína III, que es una proteína localizada en la superficie del fago, con entre 3 y 5 copias por partícula de fago y que participa en la infección de la bacteria. Los fragmentos scFv son construcciones artificiales donde las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas se han unido formando una única proteína, gracias a un pequeño péptido de unión (de 16 residuos de longitud). Al encontrarse las secuencias que codifican las scFv junto a la que codifica la proteína III del fago, ambas proteínas se expresan fusionadas en una misma cadena peptídica. Para que se produzca el empaquetamiento del fago y las scFv se presenten en su superficie, es preciso que se produzca una fusión entre las scFv y la proteína III. Además, el pHen2 contiene un gen de resistencia al antibiótico ampicilina.

El fagémido pHen2 infecta a la célula bacteriana *Escherichia coli* mediante la interacción que se produce entre la proteína III del bacteriófago (localizada en su superficie) y el *F pili* de la bacteria hospedadora. La coinfección con un fago ayudante (M13KO7) induce la activación del origen de replicación del fago y provoca que el ADN del fagémido se encapsule en partículas de fago que expresan en su superficie la fusión de la proteína III con los fragmentos scFv, utilizando las proteínas del fago ayudante. El genoma del fagémido se empaqueta y secreta de forma más eficiente que el genoma del fago ayudante que tiene su origen de replicación alterado (Hoogenboom y col., 1998).

Los medios y soluciones empleados para la obtención de anticuerpos recombinantes fueron los siguientes:

- Medio 2XTY

Bacto [®] -triptona	16	g
Bacto [®] -extracto de levadura	10	g
NaCl	5	g
Agua bidestilada	1.000	mL
Esterilización en autoclave		

- Medio 2XTY con ampicilina y glucosa

A 500 mL de medio 2XTY se le añadieron 1 mL de ampicilina para conseguir una concentración final de 100 mg/mL y 50 mL de glucosa al 50% (p/v).

- Medio 2XTY con ampicilina y kanamicina

A 500 mL de medio 2XTY se le añadieron 1mL de ampicilina para conseguir una concentración final de 100 mg/mL y 500 μ L de kanamicina a una concentración final de 25 mg/mL.

- Placas de medio 2XTYE con ampicilina y glucosa

Bacto [®] -triptona	3,2	g
Bacto [®] -extracto de levadura	2	g
NaCl	2	g
Agua bidestilada	500	mL

Al medio de cultivo se le añadieron 6 g de agar y se esterilizó en el autoclave. Se dejó enfriar y, cuando estaba a unos 50°C, se añadieron 8 mL de glucosa al 50% (p/v) y 800 μ L de ampicilina para conseguir una concentración final de 100 mg/mL. Se vertieron 30-35 mL de medio en cada placa de petri de 85 mm de diámetro y se dejaron gelificar a temperatura ambiente. Las placas se conservaron a 4°C hasta su uso.

- Solución de Polietilenglicol/cloruro sódico (PEG/NaCl)

Polietilenglicol	200	g
NaCl	146,12	g
Agua bidestilada	1.000	mL
Esterilización en autoclave		

- Tampón PBS (pH 7,2)

NaCl	8,0	g	(0,14 M)
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,9	g	(8,1 mM)
KH ₂ PO ₄	0,2	g	(1,5 mM)
KCl	0,2	g	(2,7 mM)
Agua destilada	1	L	
Esterilización en autoclave			

Para la obtención de anticuerpos recombinantes frente a oca y pato mulard se siguió el protocolo que se detalla a continuación (*Figura 31*).

III.3.4.1. PROPAGACIÓN DE LA GENOTECA

La propagación consistió en la multiplicación del fagémido pHen2 en células de *Escherichia coli* TG1 con el fin de obtener una genoteca de fagos que expresaran en su superficie distintas combinaciones de scFv. Para ello, la genoteca Griffin (que contenía aproximadamente 10^9 clones de *Escherichia coli* TG1 transformados con el fagémido pHen2) se inoculó en 50 mL de medio 2XTY con ampicilina y glucosa y se incubó a 37°C en agitación durante aproximadamente 2 horas, hasta que la absorbancia a 600 nm fue de 0,5, equivalente a 4×10^8 ufc/mL. A continuación, se coinfectó el cultivo con el fago ayudante M13KO7 (Amersham Biosciences) en una proporción 1:20 (n° de células bacterianas : n° de partículas de fago ayudante) y se incubó a 37°C durante 30 min en un baño de agua.

El fago ayudante es un colifago filamentosos M13, que contiene un gen de resistencia al antibiótico kanamicina. La coinfección de células de *Escherichia coli* con el fagémido pHen2 y el fago ayudante permite el empaquetamiento del fagémido en partículas de fago, que expresan en su superficie las distintas combinaciones de las scFv formando complejos con la proteína III. El fago ayudante proporciona la estructura proteica necesaria para el empaquetamiento del fagémido.

Las células infectadas se centrifugaron a $3.300 \times g$ durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 500 mL de medio 2XTY con ampicilina y kanamicina y se incubó en agitación a 30°C durante 15 horas para permitir la producción y liberación al medio de cultivo de partículas de fago que expresaran en su superficie, junto a la proteína III, las distintas combinaciones scFv de la genoteca.

Para concentrar el fago, se centrifugó el cultivo a $10.800 \times g$ durante 10 min y el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio, se mezcló con 50 mL de PEG/NaCl y se incubó durante 2 horas a 4°C. A continuación, se centrifugó a $10.800 \times g$ durante 30 min y el precipitado se resuspendió con 40 mL de agua bidestilada estéril y 8 mL de PEG/NaCl y se mantuvo a 4°C durante 30 min.

Tras centrifugar de nuevo a $10.800 \times g$ durante 10 min y eliminar el sobrenadante con los restos del PEG/NaCl, se resuspendió el precipitado con 5 mL de tampón

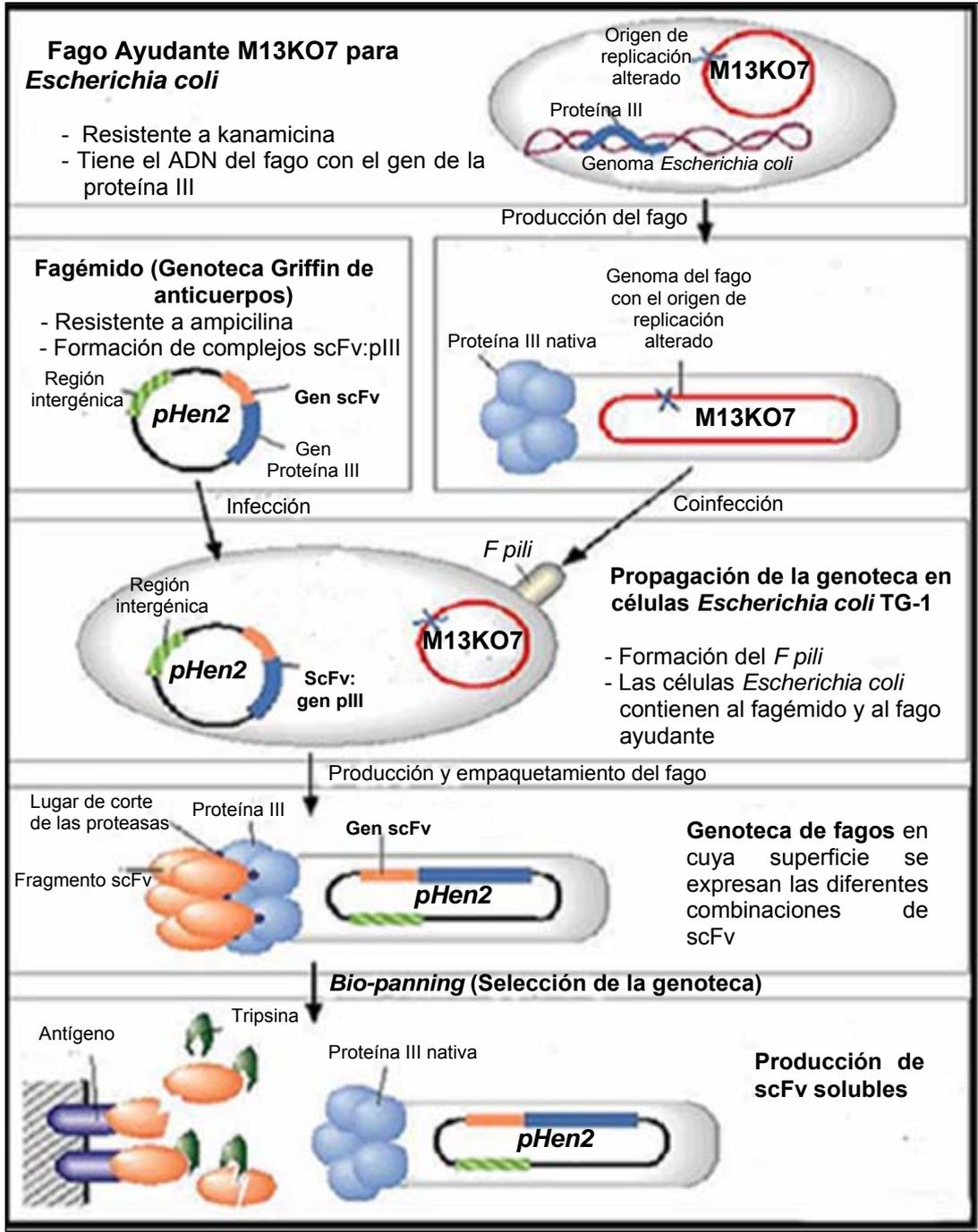


Figura 31. Representación esquemática del proceso de obtención de anticuerpos recombinantes (Adaptado de Rondot y col., 2001).

PBS y se centrifugó a $11.600 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante, que contenía el fago, se conservó a 4°C hasta su empleo.

Para comprobar la concentración de fago, se mezclaron $100 \mu\text{L}$ del sobrenadante obtenido con $900 \mu\text{L}$ de células de *Escherichia coli* TG-1, y se prepararon diluciones decimales que se sembraron en placas de medio 2XTYE con ampicilina y glucosa. Las placas se incubaron a 37°C durante 14 horas antes de realizar el recuento de colonias.

III.3.4.2. SELECCIÓN DE LA GENOTECA

La selección de anticuerpos de interés se realizó mediante inmunoafinidad inmovilizando las proteínas antigénicas solubles en la superficie de inmunotubos de polietileno MiniSorp™ de 4 mL (Nunc), y exponiéndolas a la genoteca de fagos en cuya superficie se expresan las diferentes combinaciones de scFv (proceso conocido como *bio-panning*). Para ello, se tapizó un inmunotubo con 4 mL de antígeno (muestras de *foie gras* preparadas como se describe en la sección III.3.1.), diluido en PBS, a una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó durante 14 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el periodo de incubación, el inmunotubo se lavó 3 veces con PBS, se llenó con tampón 2% MPBS (PBS al que se añadió un 2% de leche desnatada), y se incubó a 37°C durante 2 horas para bloquear los espacios libres del inmunotubo. A continuación se lavó 3 veces más con PBS y se añadieron de 10^{12} - 10^{13} partículas del fago, que expresan en su superficie las scFv, diluidas en 4 mL de 2% MPBS. El inmunotubo con los fagos se incubó a temperatura ambiente durante una hora en agitación constante a 15 rpm y durante una hora más sin agitación. Tras varios lavados con PBST (PBS que contenía Tween-20 al 0,1%) para eliminar los fagos no reaccionantes, se eluyeron los fagos unidos al antígeno añadiendo 1 mL de trietilamina 100 mM e incubando la mezcla en agitación durante 10 min. Finalmente, se añadieron $700 \mu\text{L}$ de Tris 1M (pH 7,4) para neutralizar el pH y los fagos eluidos se utilizaron para infectar células *Escherichia coli* TG-1. Para ello, se mezclaron en un tubo de centrifuga $0,75 \text{ mL}$ del fago recién eluido con $9,25 \text{ mL}$ de células *Escherichia coli* TG-1 y se añadieron 3 mL de células *Escherichia coli* TG-1 al resto de fago que permanecía en el inmunotubo. Ambas suspensiones se incubaron por separado durante 30 min a 37°C , y a continuación se mezclaron en el tubo de centrifuga.

Para evaluar la concentración del fago eluido, se prepararon diluciones decimales de la mezcla (fago+*Escherichia coli*) que se sembró en placas de medio 2XTYE con ampicilina y glucosa. Las placas se incubaron a 37°C durante 14 horas. El resto de la suspensión celular se centrifugó a 3.300 x g durante 10 min y el precipitado bacteriano se resuspendió en 1 mL de 2XTY y se sembró en superficie en una placa de 150 mm de diámetro de medio 2XTYE con ampicilina y glucosa, que se incubó a 30°C durante 14 horas.

Tras el periodo de incubación, las colonias bacterianas que crecieron en la superficie de la placa se recogieron mediante la adición de 5-6 mL de medio 2XTY y 750 µL de glicerol al 80% y arrastre con un asa de Driglasky. 100 µL de la suspensión celular obtenida se inocularon en 100 mL de medio 2XTY con ampicilina y glucosa y se incubaron a 37°C en agitación a 300 rpm hasta que la absorbancia a 600 nm fue de 0,5 (2 horas aproximadamente). Tras este periodo de incubación, 10 mL del cultivo se infectaron con el fago ayudante (M13KO7) en una proporción 1/20 y se incubaron a 37°C durante 30 min. Seguidamente, las células infectadas con el fago se centrifugaron a 3.300 x g durante 10 min, y el precipitado se resuspendió en 50 mL de medio 2XTY con ampicilina y kanamicina y se incubó durante 14 horas en agitación a 100 rpm para permitir la multiplicación del fago y su liberación al medio de cultivo.

Tras la incubación, para concentrar las partículas de fago se centrifugaron 40 mL de cultivo a 10.800 x g durante 10 min, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, se añadieron 8 mL de PEG/NaCl al sobrenadante, y se incubó en reposo a 4°C durante 2 horas. A continuación, se centrifugó de nuevo a 10.800 x g durante 10 min, se resuspendió el precipitado en 2 mL de PBS y se centrifugó a 11.600 x g durante 10 min para eliminar los restos celulares. De los 2 mL de fago obtenidos, 1 mL se mantuvo a 4°C y el otro se empleó para una nueva ronda de selección.

Para conseguir poblaciones de fagos que reconozcan “específicamente” a las proteínas de *foie gras* de oca o pato mulard es necesario repetir la selección de la genoteca 2 o 3 veces, mediante la exposición al antígeno de oca o pato (*Figura 32*).

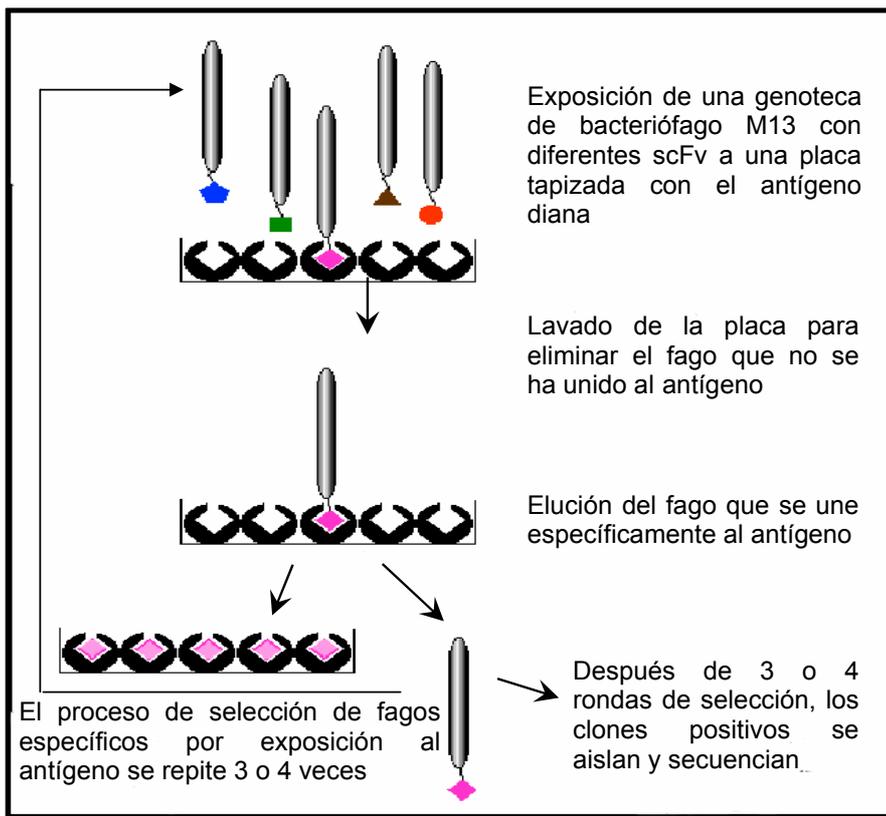


Figura 32. Representación esquemática del proceso de selección de los bacteriófagos.

III.3.4.3. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD Y AFINIDAD DE LOS CLONES POSITIVOS MEDIANTE UNA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO

Las poblaciones de fagos producidas en cada una de las rondas de selección se evaluaron mediante una técnica de ELISA indirecto para comprobar la especificidad, sensibilidad y afinidad de los fagos “policlonales” positivos. Asimismo, se utilizó la técnica de ELISA indirecto para evaluar las propiedades de los fagos procedentes de un único clon (colonia bacteriana infectada), denominados monoclonales.

III.3.4.3.1. Identificación de fagos “Policlonales”

Antígenos

Se utilizaron como antígenos las muestras de *foie gras* de oca y pato mulard preparadas como se describe en la sección III.3.1.

Anticuerpos

A cada pocillo se incorporaron 10 μL del fago obtenido (apartado III.3.4.2.) y 90 μL de 2% MPBS.

Conjugado

Se empleó un conjugado comercial anti-M13, marcado con la enzima peroxidasa de rábano (Sigma). El conjugado se utilizó diluido 1:1.000 en tampón PBSTM.

Metodología del ELISA indirecto en placa

La metodología empleada fue idéntica a la descrita en el apartado III.3.3.1. La intensidad de la reacción se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 450 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

III.3.4.3.2. Identificación de fagos “Monoclonales”

Previamente al desarrollo de una técnica de ELISA indirecto para la identificación de fagos que expresan anticuerpos scFv “monoclonales” se procedió a su aislamiento. Para ello, los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos de 0,3 mL (Nunc) se llenaron con 100 μL de medio 2XTY con ampicilina y glucosa y en cada pocillo se inoculó una colonia aislada (cada una correspondiente a un clon) de las placas de petri obtenidas en el apartado III.3.4.2. La placa se incubó a 37°C durante 14 horas, agitándose a 300 rpm.

Tras la incubación, se transfirió un pequeño inóculo (aproximadamente 2 μL) de cada pocillo de esta placa a otro pocillo de una nueva placa que contenía 175 μL de medio 2XTY con ampicilina y glucosa y se incubó en agitación a 37°C durante 1 hora. Seguidamente, se añadieron a cada pocillo 25 μL de medio 2XTY con ampicilina y glucosa y 10^9 unidades de fago ayudante. La placa se incubó en reposo a 37°C durante 30 min y luego en agitación a 300 rpm durante 1 hora a la misma temperatura. A continuación, se centrifugó la placa a 1.800 x g durante 10

min, se eliminó el sobrenadante de los pocillos, y el precipitado se resuspendió en 175 μ L de medio 2XTY con ampicilina y kanamicina. La placa se incubó a 30°C durante 14 horas, con agitación a 300 rpm.

Finalmente, el sobrenadante obtenido tras centrifugar de nuevo la placa a 1.800 x g durante 10 min, se empleó como anticuerpo en la técnica de ELISA indirecto (se añadieron a cada pocillo 50 μ L de sobrenadante y 50 μ L de 4% MPBS en la etapa de adición del anticuerpo) realizada de la misma manera que en el apartado III.3.4.4.1. La intensidad de la reacción se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 450 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

III.3.4.4. PRODUCCIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS (scFv) SOLUBLES

La producción de fragmentos de anticuerpos solubles no se llevó a cabo ante la falta de fagos recombinantes (scFv+fagémido) que reconocieran específicamente a la oca o al pato mulard. El proceso hubiera consistido en la recuperación del fragmento scFv de la superficie del fago, mediante el empleo de tripsina. Posteriormente, se habría procedido a comprobar, mediante una técnica de ELISA indirecto, que el resultado obtenido al emplear el fragmento scFv recuperado de la superficie del fago era el mismo que el obtenido cuando se empleaba el fragmento scFv unido al fago.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

IV.1. IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE OCA, PATO, POLLO, PAVO, CERDO, VACA, OVEJA y CABRA

Para llevar a cabo la identificación genética de las especies empleadas en la producción de *foie gras* (oca y pato) así como de otras especies que pueden incorporarse fraudulentamente en estos productos, se desarrollaron los siguientes objetivos:

- a) Selección de marcadores génicos y diseño de cebadores apropiados.
- b) Puesta a punto de un método de extracción de ADN a partir del tejido hepático, muscular y graso de las especies de interés, en productos frescos y sometidos a distintos tratamientos térmicos.
- c) Amplificación por PCR de los marcadores génicos seleccionados empleando los cebadores elegidos.
- d) Desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de pato en mezclas de *foie gras*. Asimismo se aplicó esta metodología para la cuantificación de cerdo en mezclas de cerdo/vaca.

A continuación se describen los resultados obtenidos con relación a los objetivos planteados en este trabajo.

IV.1.1. SELECCIÓN DE MARCADORES GÉNICOS Y DISEÑO DE CEBADORES

Los marcadores génicos seleccionados en este trabajo fueron los genes nucleares 5S ADNr y α -actina, y el gen mitocondrial 12S ARNr. El análisis de dichos marcadores permitió la selección y el diseño de cebadores para su posterior empleo en las técnicas genéticas desarrolladas.

IV.1.1.1. GEN NUCLEAR 5S ADNr

La pareja de cebadores 5S1-5S2 se seleccionó de la bibliografía consultada (Pendás y col., 1995). En la sección III.2.2.1 se muestran sus secuencias.

Los oligonucleótidos 5SG y 5SD se diseñaron con el fin de amplificar, junto con el cebador 5S3, un fragmento específico del gen 5S ADNr de oca y pato respectivamente. Para ello, se utilizaron las secuencias del gen 5S ADNr obtenidas

tras la amplificación de un fragmento de ADN de 237 pb en las muestras de oca y 246 pb en las de pato, utilizando los cebadores 5S1-5S2.

Estos fragmentos se secuenciaron y las secuencias obtenidas se analizaron con el programa PILEUP del paquete informático GCG. Igualmente, se estudió con el programa FASTA la hibridación de las parejas de cebadores 5S3-5SG y 5S3-5SD con las secuencias del gen 5S ADNr pertenecientes a otras especies, para comprobar que dichos cebadores fueran específicos. El cebador 5SG se une a los nucleótidos 175-193 del fragmento espaciador (NTS) del gen 5S ADNr secuenciado en la oca y el cebador 5SD a los nucleótidos 114-128 del NTS del mismo gen secuenciado en el pato. Sus secuencias se muestran en la sección III.2.2.1.

IV.1.1.2. GEN NUCLEAR α -ACTINA

Los cebadores Act2 y Act4 se seleccionaron a partir de los datos recogidos en la bibliografía (Watabe y col., 1995). Estos oligonucleótidos delimitan un fragmento de 985 pb, 983 pb, 1.000 pb y 707 pb del gen α -actina en la oca, el pato, el pollo y el cerdo, respectivamente. En la sección III.2.2.2 se muestran sus secuencias.

Estos fragmentos se secuenciaron y las secuencias obtenidas se analizaron con el programa PILEUP del paquete informático GCG, y se emplearon para diseñar los oligonucleótidos ActG, ActD, ActC y ActP con el fin de amplificar, junto con el cebador actinv, un fragmento específico del gen α -actina de oca, pato, pollo y cerdo, respectivamente.

Los cebadores ActG, ActD, ActC y ActP amplificaron fragmentos específicos de especie de 172 pb, 225 pb, 154 pb y 392 pb. Sus secuencias se muestran en la sección III.2.2.2.

IV.1.1.3. GEN MITOCONDRIAL 12S ARNr

Los oligonucleótidos 12SFW y 12SREV se diseñaron a partir de las secuencias disponibles en las bases de datos para las especies objeto de análisis, con la excepción de la oca, de la cual no se encontró ninguna secuencia del gen 12S ARNr. Estos oligonucleótidos delimitan un fragmento de 392 pb, 394 pb, 402 pb, 404 pb y 400 pb del gen 12S ARNr de oca, pato, pollo, cerdo y pavo.

Asimismo, se diseñaron los cebadores 12SFWM y 12SSEQ que amplificaron un fragmento de 399 pb, 398 pb, 397 pb y 400 pb en las muestras de vaca, oveja, cabra y cerdo.

Tras secuenciar los fragmentos amplificados en las ocho especies objeto de estudio, se procedió al diseño de ocho cebadores inversos (12SG, 12SD, 12SC, 12SP, 12ST, 12SBT, 12SOA y 12SCH) que amplificaron fragmentos específicos de especie. Los cebadores 12SG, 12SD, 12SC, 12SP y 12ST, conjuntamente con el cebador directo 12SFW, amplificaron fragmentos específicos de 244 pb, 373 pb, 285 pb, 387 pb y 122 pb, a partir del ADN de oca, pato, pollo, cerdo y pavo. De igual forma, los cebadores 12SBT, 12SOA y 12SCH, conjuntamente con el cebador directo 12SFWM, amplificaron fragmentos específicos de 223 pb, 371 pb y 142 pb, a partir del ADN de vaca, oveja y cabra. El diseño de los cebadores se realizó con ayuda del programa PRIMER EXPRESS® versión 2,0 (Applied Biosystems). Las secuencias de los oligonucleótidos 12SFW, 12SREV, 12SFWM, 12SSEQ, 12SG, 12SD, 12SC, 12SP, 12ST, 12SBT, 12SOA y 12SCH se muestran en la sección III.2.2.3.

IV.1.2. EXTRACCIÓN DEL ADN

Para la extracción de ADN a partir de *foie gras* de oca y pato, y a partir de hígado, tejido muscular y tejido graso de pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra se utilizaron cuatro métodos diferentes: el método de DeSalle y col., (1993), el método de DeSalle y col., (1993) modificado, el *kit* comercial *Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food* (Promega) y el *kit* comercial *Wizard® DNA Clean-up* (sección III.2.3).

Para determinar la validez de los cuatro protocolos se evaluó la integridad, grado de pureza y la concentración de los ADNs obtenidos con cada uno de ellos (*Tabla 17*). Asimismo, se comprobó si a partir de dicho ADN era posible la amplificación por PCR.

Los resultados obtenidos con los distintos métodos de extracción ensayados muestran que el protocolo de DeSalle y col., (1993) modificado en este trabajo para adaptarlo a las características del *foie gras* y el protocolo de *Wizard® DNA Clean-up* resultaron los más adecuados para la extracción del ADN de las muestras de

foie gras de pato y oca, así como de muestras de hígado, tejido muscular, grasa y mezclas binarias de las especies de animales de abasto estudiadas.

Tabla 17. Comparación de las características del ADN obtenido a partir de *foie gras*, hígado, tejido muscular y grasa utilizando diversos métodos de extracción

	Pureza		Concentración (ng/μL)	Integridad	Amplificación por PCR
	$\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$	$\frac{A_{230nm}}{A_{260nm}}$			
DeSalle y col., (1993)	1,6-1,8	0,3-0,7	1.000-4.000	degradados	NO
Wizard® magnetic	1,1	0,3-0,7	200	degradados	Sí
DeSalle y col., (1993) modificado	1,6-1,8	0,3-0,7	1.000-4.000	degradados	Sí
Wizard® DNA Clean-up	1,6-1,8	0,3-0,7	200-500	degradados	Sí

El ADN extraído de muestras de *foie gras* con el protocolo de DeSalle y col., (1993) se encontraba degradado. La concentración de ADN en las muestras superaba los 1.000 ng/μL, llegando incluso hasta los 4.000 ng/μL, pero no permitió la amplificación mediante PCR.

El ADN extraído de las muestras de *foie gras* con el protocolo de DeSalle y col., (1993) modificado, también se encontraba degradado (*Figura 33*). La concentración de ADN superaba los 1.000 ng/μL, llegando incluso hasta los 4.000 ng/μL en algunas muestras, y resultó adecuado para la amplificación mediante PCR.

Utilizando los kits comerciales *Wizard™ Magnetic DNA Purification System for Food* y *Wizard™ DNA Clean-up*, el ADN se extrajo en menos de 2 h, con una concentración de aproximadamente 200-500 ng/μL y se encontraba degradado. En todos los casos, el ADN obtenido presentó una relación A_{260nm}/A_{280nm} de 1,6-1,8 y A_{230nm}/A_{260nm} de 0,3-0,7, excepto con el método de extracción *Wizard™ Magnetic DNA Purification System for Food*, donde la relación A_{260nm}/A_{280nm} fue solo de 1,1. Los kits comerciales y el método de DeSalle modificado permitieron la amplificación mediante PCR.

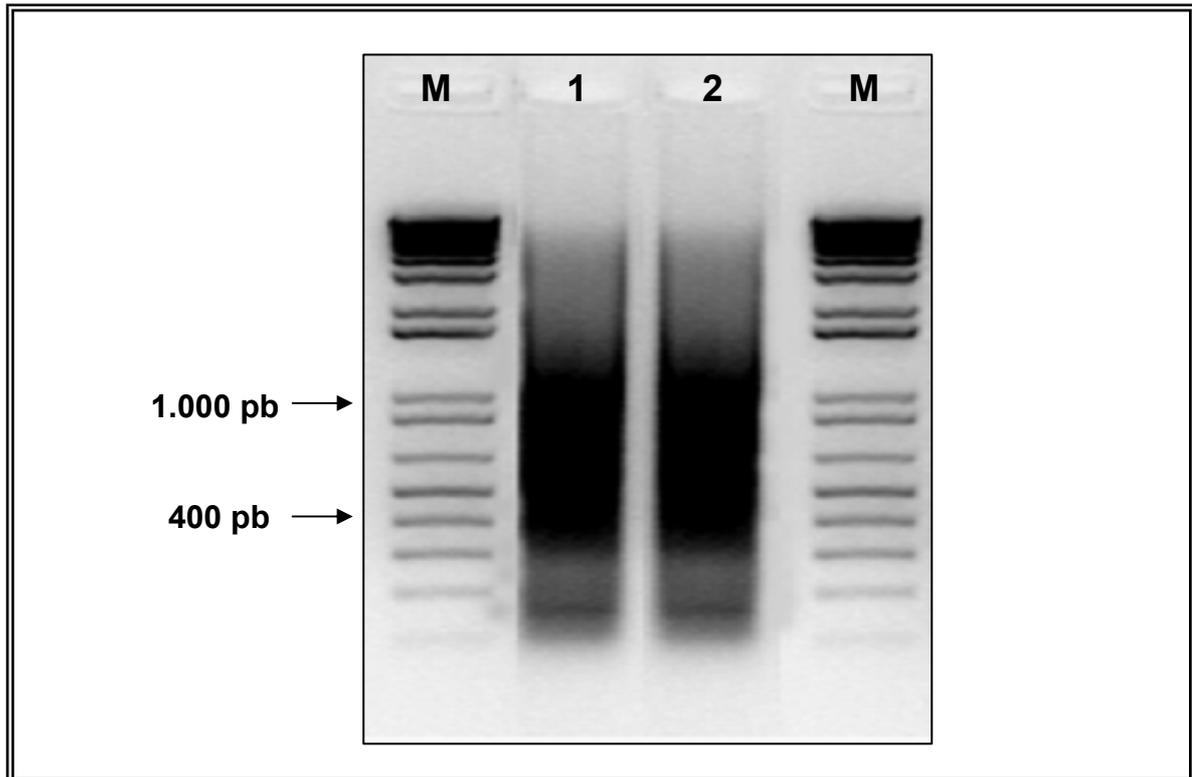


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa de 1 μ g del ADN obtenido a partir de *foie gras* de oca (1) y pato (2), utilizando el método de DeSalle y col., (1993) modificado. (M) corresponde al marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

IV.1.3. ANÁLISIS DE LOS MARCADORES SELECCIONADOS MEDIANTE DIVERSAS TÉCNICAS GENÉTICAS

A continuación se exponen los resultados obtenidos al emplear los marcadores seleccionados en este trabajo para la identificación genética de oca, pato, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra.

IV.1.3.1. GEN 5S ADNr

IV.1.3.1.1. Amplificación por PCR y secuenciación

Empleando las condiciones descritas en la sección III.2.5.1.1, se amplificó el gen 5S ADNr con la pareja de cebadores 5S1-5S2, obteniéndose fragmentos de distintos tamaños en función de la especie analizada. El análisis electroforético de los productos de PCR permitió constatar la amplificación de 1 a 4 fragmentos en el ADN de oca y pato, que correspondían a la amplificación de una o varias unidades

del gen 5S ADN_r, ya que la unidad básica (5S ARN_r + NTS) se repite en el cromosoma un número variable de veces dependiendo de la especie. Tan sólo se secuenciaron los fragmentos de menor tamaño, que correspondían a 237 pb en la oca y a 246 pb en el pato (*Figura 34*).

Los productos de PCR correspondientes a dos individuos de oca y otros dos de pato se purificaron siguiendo el protocolo descrito en la sección III.2.7.1 y se secuenciaron. Para la secuenciación de los productos de PCR de oca y pato se utilizaron los cebadores 5S1 y 5S2. La secuencia parcial obtenida con el cebador 5S1 se superpuso con la inversa y complementaria de la obtenida con el cebador 5S2 con el fin de determinar la secuencia completa de cada producto de PCR. Sin embargo, el resultado no resultó satisfactorio, ya que se obtuvieron secuencias de muy baja calidad.

Por ello, se decidió clonar el fragmento de menor tamaño amplificado a partir de los ADNs de oca y pato (237 pb y 246 pb, respectivamente) en el vector *pGEM[®] -T Easy*, según se describe en la sección III.2.7.2. Como resultado de la clonación, se obtuvieron colonias de *Escherichia coli* transformadas que albergaban cada uno de los dos insertos de ADN.

Tras la amplificación por PCR de las colonias transformadas utilizando los cebadores del vector (M13F y M13R), se comprobó por electroforesis que los productos de PCR tenían un tamaño adecuado (pb correspondientes al producto de PCR insertado más pb correspondientes al vector) (*Figura 35*). Estos productos se secuenciaron con los cebadores M13F y M13R.

La secuencia parcial obtenida con el cebador M13F se superpuso con la inversa y complementaria de la obtenida con el cebador M13R con el fin de determinar la secuencia completa de cada producto de PCR. El análisis de las secuencias confirmó la identidad y la longitud de los fragmentos del gen 5S ADN_r de oca y pato. Una vez completadas las secuencias correspondientes a las bandas del gen 5S ADN_r obtenidas en la oca y el pato, estas se alinearon utilizando el programa PILEUP del paquete informático GCG.

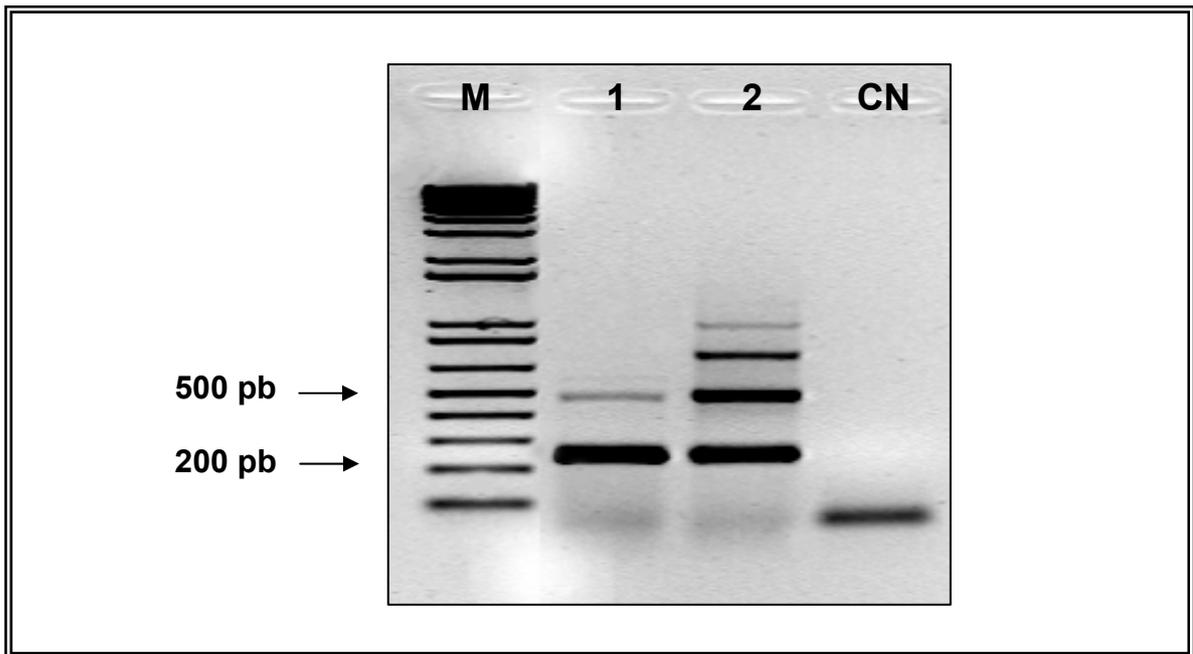


Figura 34. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 5S ADNr amplificados con los cebadores 5S1 y 5S2 a partir de muestras de pato (1) y oca (2). (M) corresponde al marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder* y (CN) al control negativo.

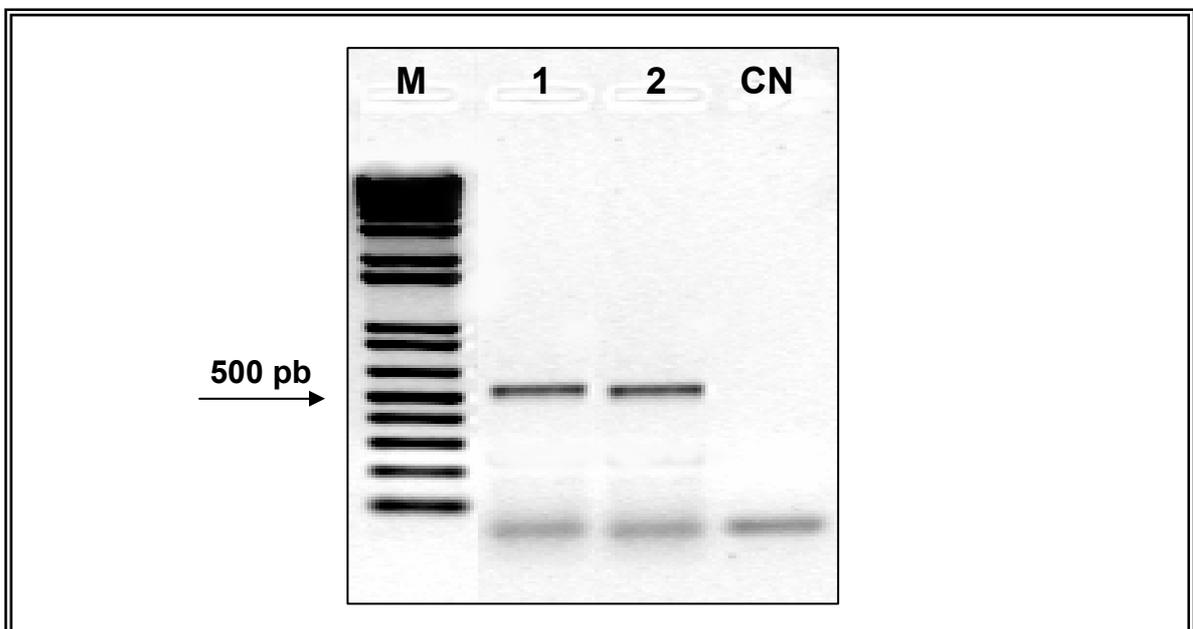


Figura 35. Análisis electroforético de los insertos de ADN amplificados con los cebadores M13F y M13R. Muestras: pato (1) y oca (2). (M) corresponde al marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder* y (CN) al control negativo.

El análisis comparativo de dichas secuencias permitió diseñar los cebadores 5SG y 5SD, específicos de oca y pato respectivamente, en el espaciador NTS (*Figura 36*) y el cebador 5S3 en la región codificante. Una vez diseñados estos cebadores, se comprobó mediante el programa FASTA que la hibridación de los mismos era específica de la especie de interés, así como de la secuencia del fragmento de ADN utilizado para su diseño.

Siguiendo las condiciones descritas para las reacciones de PCR (sección III.2.5.1.2.), el cebador 5SG, junto con el 5S3, amplificó un fragmento de 171 pb en las muestras de oca, mientras que no hubo amplificación en las muestras de pato. Los cebadores 5SD y 5S3 dieron lugar a un fragmento amplificado de ADN de 106 pb en las muestras de pato, y ninguna banda en las de oca. Cuando los cebadores 5S3 (cebador directo), 5SG y 5SD (cebadores inversos) se utilizaron en una misma reacción de PCR (PCR múltiple) dieron lugar a las bandas de ADN especie-específicas anteriormente señaladas (*Figura 37*). Cuando se analizaron muestras de *foie gras* sometidas a tratamientos de pasteurización y esterilización, se obtuvieron los mismos resultados descritos para las muestras frescas.

IV.1.3.2. GEN α -ACTINA

IV.1.3.2.1. Amplificación por PCR y secuenciación

Empleando la pareja de cebadores Act2/Act4 se amplificó un fragmento de aproximadamente 1.000 pb del gen nuclear α -actina en la oca, el pato y el pollo y de 700 pb en el cerdo (*Figura 38*). La amplificación se llevó a cabo según las condiciones descritas en la sección III.2.5.2.

Los productos de PCR obtenidos a partir de dos muestras de cada una de las especies estudiadas (oca, pato, pollo y cerdo) se purificaron siguiendo el protocolo descrito en la sección III.2.7.1, y se secuenciaron en el Centro de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. Para lograr su secuenciación, se clonó el fragmento de mayor tamaño amplificado en cada especie, aproximadamente 1.000 pb en la oca, el pato y el pollo y 700 pb en el cerdo (*Figura 38*) en el vector *pGEM[®]-T Easy*, según se describe en la sección III.2.7.2.

	1			5S3 →	50
pato	<u>TACGCCCGAT</u>	<u>CTCGTCCGAT</u>	CTCGGAAGCT	AAGCAGGGTC	GGGCCCGGTT
		cebador 5S1 →			
oca	<u>TACGCCCGAT</u>	<u>CTCGTCCGAT</u>	CTCGGAAGCT	AAGCAGGGTC	GGGCCCGGTT
		cebador 5S1 →			
	51				100
pato	AGTACTTGGA	TGGGAGACCT	CCTGGAATA	CCGGGTGCTG	TAGGCTTTTG
oca	AGTACTTGGA	TGGGAGACCT	CCTGGAATA	CCGGGTGCTG	TAGGCTTTT.
	101		← 5SD		150
pato	TCTTTGCCGT	CGG GGGGGC	TTTTGCGGG	CCAGGGGCGC	CGCCTGTTGG
ocaGC	CTTTGCGGGG	CCAGGGGCGC	CCCCTTTTGC
	151				200
pato	CAGGGAGACC	GTGGCACAGA	CCGTCGCCGC	GGCGGCGGTT
oca	CAGGGAGGCG	GTGGCACAGG	CCGTCGCCTG	GGTGTGCGTT	GAT GGTGCAG
	201				250
pato	GCCTGGGGAA	GAGGGCTGTT	GTCGGGGAGG	AGGGT <u>GCTTA</u>	<u>CGGCCATACC</u>
				← cebador 5S2	
oca	GTGTGGGGAA	GAGGGCTGTT	GCCGGGGAAG	AGGGT <u>GCTTA</u>	<u>CGGCCATACC</u>
	← 5SG			← cebador 5S2	
	251 256				
pato	<u>AGCCTG</u>				
oca	<u>AGCCTG</u>				

Figura 36. Secuencias de ADN de pato y oca correspondientes a los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos 5S1 y 5S2, y que han sido utilizadas para el diseño de los cebadores 5SG, 5SD y 5S3. La secuencia correspondiente a la zona codificante del gen 5S ADN_r está indicada en negrita; el resto de la secuencia corresponde al fragmento espaciador NTS. Los oligonucleótidos 5S1, 5S2 aparecen subrayados. Los cebadores 5S3, 5SG y 5SD aparecen sombreados.

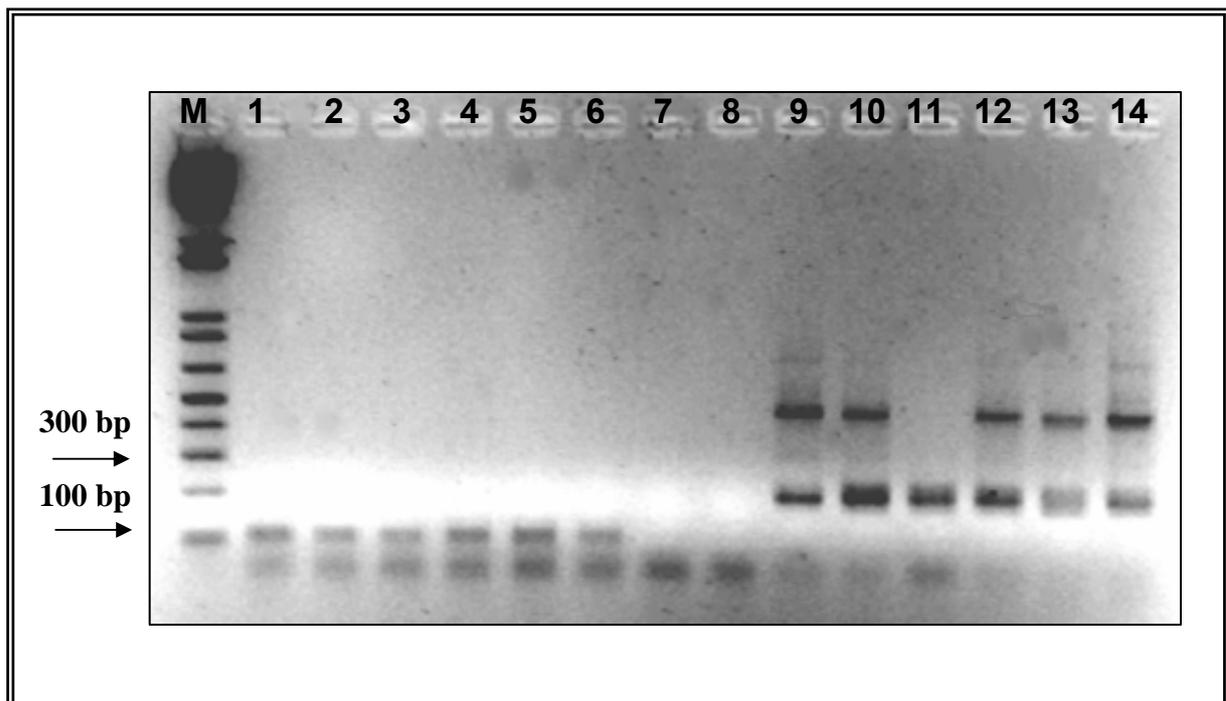


Figura 37. Análisis electroforético de los fragmentos del gen 5S ADNr amplificados mediante PCR múltiple utilizando los cebadores 5S3, 5SG y 5SD. Las muestras son: pato (1-6), pollo (7), cerdo (8) y oca (9-14). Los tratamientos térmicos son: muestras frescas (1, 2, 7, 8, 9 y 10), pasteurizadas (3, 4) y esterilizadas (5, 6, 11-14). (M) corresponde al marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*.

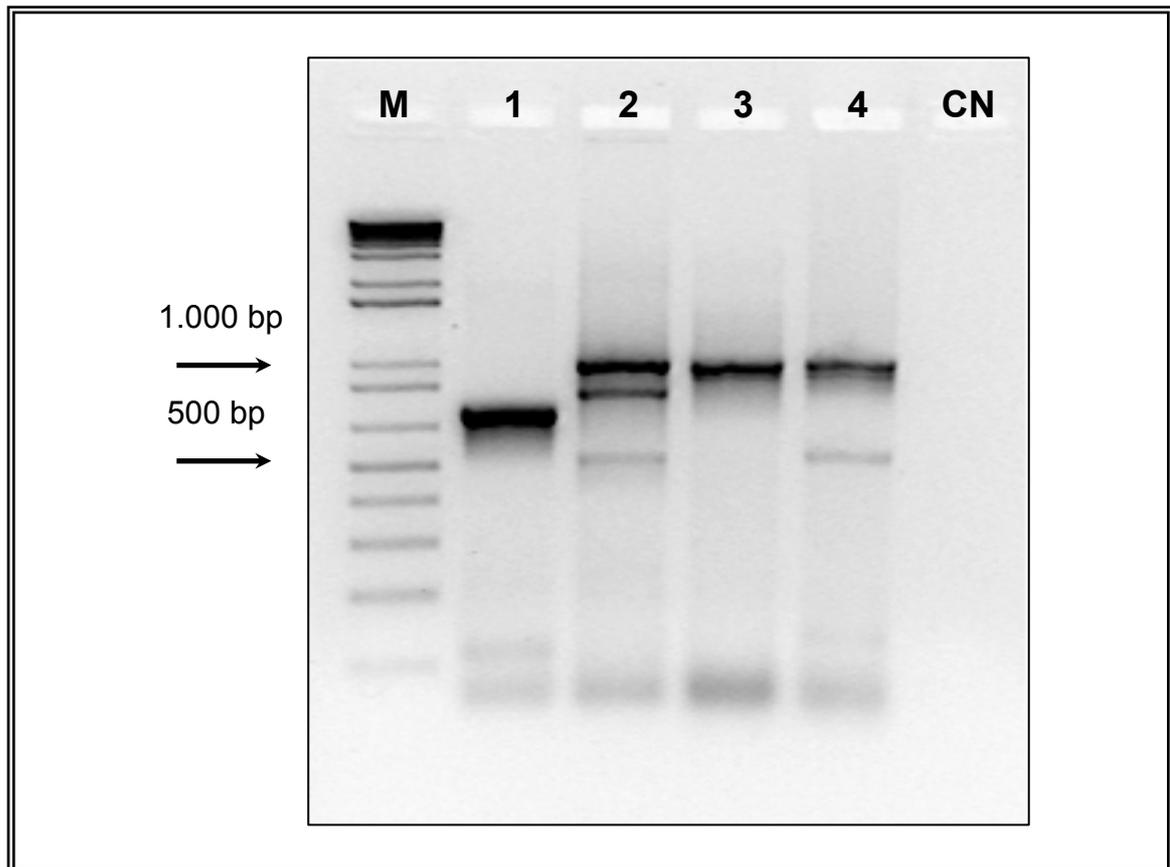


Figura 38. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen α -actina amplificados con los cebadores Act2/Act4. Muestras: cerdo (1), pollo (2), pato (3) y oca (4). (CN) control negativo y (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

Como resultado de la clonación, se obtuvieron colonias de *Escherichia coli* transformadas que albergaban cada uno de los insertos de ADN de las cuatro especies estudiadas. Tras la amplificación por PCR de las colonias transformadas, utilizando los cebadores del vector (M13F y M13R), se comprobó por electroforesis que los productos de PCR tenían un tamaño adecuado (pb correspondientes al producto de PCR insertado más pb correspondientes al vector) (*Figura 39*).

Estos productos se secuenciaron con los cebadores M13F y M13R. Además fue necesario utilizar un tercer oligonucleótido, Act3, localizado en el tercer exón, para llevar a cabo la secuenciación completa del fragmento de 1.000 pb en la oca, el pato y el pollo y de 700 pb en el cerdo. Las secuencias parciales obtenidas con los oligonucleótidos M13F, M13R y Act3 se superpusieron, para obtener la secuencia completa de cada producto de PCR. Tras el análisis de las secuencias, se verificó la identidad y la longitud de los fragmentos del gen nuclear α -actina de oca, pato, pollo y cerdo.

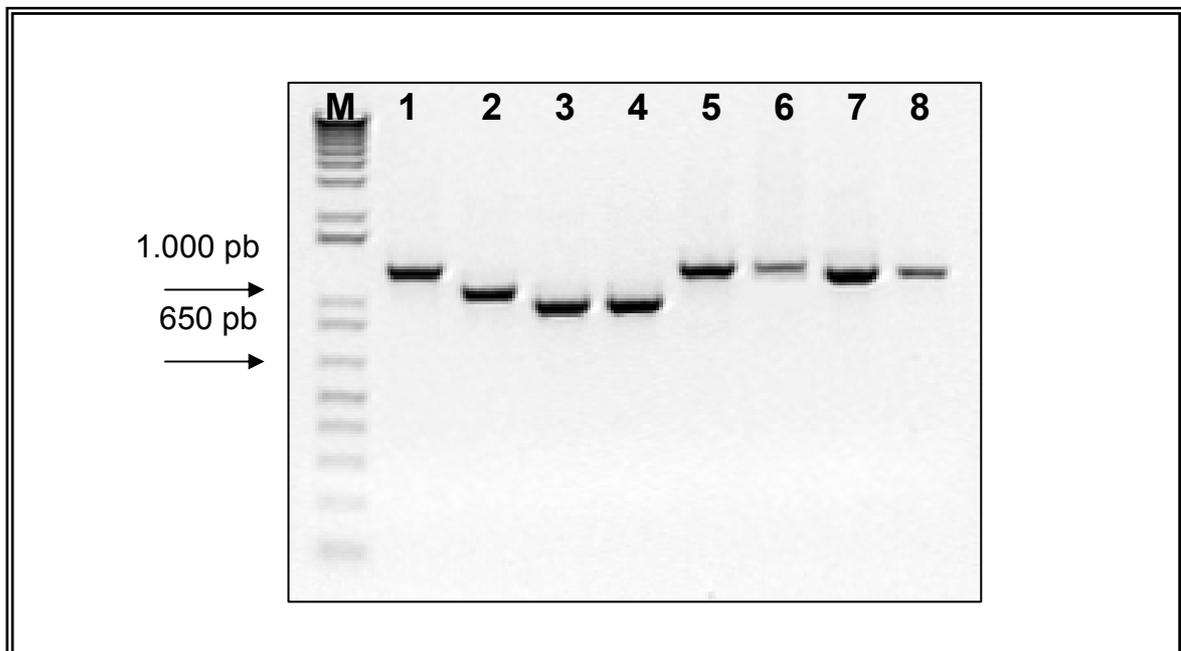


Figura 39. Análisis electroforético de los insertos de ADN amplificados con los cebadores M13F y M13R. Muestras: pollo (1-2), cerdo (3-4), pato (5-6) y oca (7-8). (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

La *Figura 40* muestra las secuencias alineadas del gen α -actina de oca, pato, pollo y cerdo. También se indican los lugares de unión de los cebadores Act2, Act3 y Act4 utilizados en la amplificación y secuenciación. Además, para verificar la identidad de este gen, las secuencias obtenidas a partir de los productos de PCR de oca, pato, pollo y cerdo se compararon con las secuencias del ADNc del gen que codifica la actina del músculo esquelético en el hombre (número de acceso M20543), el ratón (M12866), la vaca (U02285), el pollo (M13756) y el cerdo (U16368), obtenidas de la base de datos GenBank/EMBL. La alineación permitió comprobar que las secuencias de los productos de PCR obtenidos a partir de las muestras de oca, pato, pollo y cerdo eran semejantes a las secuencias con las que se comparaban. La diferencia observada entre el tamaño amplificado en oca, pato y pollo (fragmento ~1.000 pb) y el fragmento amplificado en cerdo (fragmento ~700 pb), se debe a la presencia de tres intrones en las muestras de oca, pato y pollo y de sólo 2 intrones en las muestras de cerdo, como se observa en la *Figura 40*. En la *Figura 41* se muestran las diferencias en la secuencia aminoacídica de las cuatro especies objeto de estudio.

IV.1.3.2.2. Diseño de cebadores específicos y amplificación de fragmentos específicos de especie

Mediante los programas PILEUP y PRETTY del paquete informático GCG, se alinearon y construyeron secuencias consenso a partir de las secuencias del gen α -actina obtenidas de los productos de PCR de oca, pato, pollo y cerdo. A continuación, mediante el programa PRIMER EXPRESS® (Applied Biosystems), se diseñaron cebadores directos específicos de oca, pato, pollo y cerdo que permitieran la identificación del origen específico de las muestras.

La especificidad de los cuatro cebadores se confirmó mediante la amplificación por PCR del ADN genómico de oca, pato mulard, pollo, pavo y cerdo. La pareja de cebadores ActG/actinv, amplificó un fragmento de 172 pb en la oca, mientras que no se obtuvo amplificación en las muestras de ADN de pato mulard, pollo, pavo y cerdo (*Figura 42*).

El cebador ActD, junto con el cebador inverso actinv, amplificó un fragmento de 225 pb en el pato, mientras que no se obtuvo amplificación en las muestras de ADN de

Figura 40. Secuencias de ADN correspondientes a los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos Act2 y Act4 a partir de muestras de oca, pato, pollo y cerdo. Los cebadores Act2 (directo), Act3 (inverso) y Act4 (inverso) se indican en negrita. Los cebadores específicos de especie (ActG, ActD, ActC y ActP) y el cebador inverso común (actinv) se muestran subrayados. La secuencia de los exones se representa en mayúscula, mientras que la de los intrones se hace en minúscula.

	1	Act2 →				50
Pollo	TACCTGATGA	AGATCCTCAC	TGAGCGTGGC	TATTCCTTTG	TCACCACAGg	
Cerdo	TACCTCATGA	AGATCCTCAC	TGAGCGGGGC	TACAGCTTCA	CCACCACGG.	
Pato	TACCTCATGA	AGATCCTCAC	TGAGCGTGGC	TATTCCTTCG	TCACCACGGg	
Oca	TACCTGATGA	AGATCCTCAC	TGAGCGTGGC	TATTCCTTCG	TCACCACGGg	
	51					100
Pollo	taagcaactgt	tatctcctcc	aaaatgtctc	cccacgttcc	caactctcgc	
Cerdo	
Pato	taagcaccgc	t.ctgcccc	aaaatgtcct	ccctcgtttc	cagcccttgc	
Oca	taagcaactgc	t.cttcccc	aaaacgtcct	ccttcatttc	cagctcttgc	
	101					150
Pollo	acatcaacca	atgctgcagc	ctcttgccgt	actgcaagcc	ctggttctgc	
Cerdo	
Pato	acctctgggg	atgctgtagc	ctcttgcccc	gttgcaagcc	cagggagtgc	
Oca	acctctgggg	atgctgtagc	ctcttgcccc	gttgcaagcc	atgggagtgc	
	151					200
Pollo	tccctgttgg	gcatttgctt	gtggcttgtg	gtctggagac	ccagcagacg	
Cerdo	
Pato	tccctgttgg	gcatttgctt	gtggcttaggg	gtctggagac	ccagcaaacc	
Oca	tccctgttgg	gcgcttgctt	gcggttaggg	gtctggagac	ccagcagacc	
	201					250
Pollo	tgtggaggcg	ttgcgagcgt	t.....tc	ctgttctttc	ccctccttgc	
Cerdo	
Pato	cgtgtaggag	ctgcaggtgt	tctgtttctc	ttctgtttct	cctttgttgc	
Oca	tgtggaggag	ttgcaagtgt	tctgtttc..cc	ccttcattgc	
	251					300
Pollo	aatcaactgac	gcctttgctc	cccctgacag	CTGAACGTGA	GATTGTCCGT	
Cerdo	CCGAGCGGGA	GATCGTGCGG	
Pato	aatcagtgat	gcctttgctc	cccctgacag	CTGAACGTGA	GATTGTCCGT	
Oca	aatcaactggt	ggctttgctc	cccctgacag	CTGAACGTGA	GATTGTCCGT	
	301					350
Pollo	GACATCAAGG	AGAAGCTGTG	CTATGTGGCT	CTGGACTTTG	AGAACGAGAT	
Cerdo	GACATCAAGG	AGAAGCTCTG	CTACGTCGCC	CTGGACTTCG	AGCAGGAGAT	
Pato	GACATCAAGG	AGAAGCTGTG	CTATGTGGCG	CTGGACTTTG	AAAACGAGAT	
Oca	GACATCAAGG	AGAAGCTGTG	CTATGTGGCG	CTGGACTTTG	AGAACGAGAT	
	351					400
Pollo	GGCCACCGCT	GCCTCCTCCT	CCTCCCTGGA	GAAGAGCTAT	GAGCTGCCTG	
Cerdo	GGCCACCGCC	GCGTCCTCCT	CCTCCCTGGA	GAAGAGCTAC	GAGCTGCCCC	
Pato	GGCCACTGCC	GCCTCCTCCT	CCTCCCTCGA	GAAGAGCTAC	GAGTTGCCTG	
Oca	GGCCACTGCC	GCCTCCTCCT	CCTCCCTCGA	AAAGAGCTAC	GAGTTGCCTG	

Figura 40. (continuación)

	401				450
Pollo	ATGGGCAGGT	CATCACCATC	GGCAATGAGC	GTTTCCGCTG	CCCAGAAACC
Cerdo	ACGGCCAGGT	CATCACCATC	GGCAACGAGC	GCTTCCGGTG	TCCAGAGGGC
Pato	ATGGGCAGGT	CATCACCATC	GGCAATGAAC	GTTTCCGTTG	CCCAGAAACC
Oca	ATGGGCAGGT	CATCACCATC	GGCAATGAAC	GTTTCCGTTG	CCCAGAAACC
	451				500
Pollo	CTCTTCCAGC	CTTCCTTCAT	TGgtgcggtgc	cccccttccct	ctgtccttcc
Cerdo	CTCTTCCAGC	CCTCCTTCCT	GGgtaggtgt	cgggcagcgc	ggcctgcctg
Pato	CTCTTCCAGC	CTTCCTTCAT	CGgtgcggtgc	cccccttccc	tctcccctcc
Oca	CTCTTCCAGC	CTTCCTTCAT	TGgtgcggtgc	cccccttccc	tctcccctcc
	501				550
Pollo	cgggcagctc	tctgcgctctcct	ggcacagctc	ctgcttagct
Cerdo	gggggggccc	gggggctcgt	ccccttgca	gggggaccgc	taagggggcg
Pato	ccagcagctc	ccccctctct	gctgagccct	ggcacagagc	tcttgcttgg
Oca	ccagcagctc	ccccccctct	cctgagtcct	ggcacagagc	tcttgcttgg
	551 ActP →				600
Pollo	cacttagctc	acgcctgctc	ttcttc....	...tgcccc	agGTATGGAG
Cerdo	<u>ctctgtcggc</u>ctctc	agGCATGGAG
Pato	cgctgacctt	gtccctgctc	ttcacc...	...tgcccc	agGCATGGAG
Oca	cgcttaactt	gtgcctgctc	ttcaccctt	ccttgcccc	agGCATGGAG
	601				650
Pollo	TCCGCTGGGA	TCCATGAGAC	AACTTACAAC	AGCATCATGA	AATGCGACAT
Cerdo	TCCTGCGGCA	TCCACGAGAC	CACCTTCAAC	TCGATCATGA	AGTGGCAGGT
Pato	TCCGCGGGCA	TCCATGAGAC	GACCTACAAC	AGCACCATGA	AGTGGCAGAT
Oca	TCCGCGGGCA	TCCATGAGAC	AACCTACAAC	AGCATCATGA	AGTGGCAGAT
	651 ← Act3				700
Pollo	TGACATCAGG	AAGGACCTGT	ATGCCAACAA	CGTCATGTCT	GGGGGTACCA
Cerdo	GGACATCAGG	AAGGACCTCT	ACGCCAACAC	GGTGCTGTCT	GGCGGGACCA
Pato	TGACATCAGG	AAGGACCTGT	ACGCCAACAA	CGTCATGTCT	GGGGGTACCA
Oca	TGACATCAGG	AAGGACCTGT	ACGCCAACAA	CGTCATGTCT	GGGGGTACCA
	701				750
Pollo	CCATGTACCC	AGGTATTGCT	GACCGCATGC	AAAAGGAGAT	CACAGCCCCTG
Cerdo	CCATGTACCC	CGGCATCGCC	GACAGGATGC	AGAAGGAGAT	CACGGCCCCTG
Pato	CCATGTACCC	AGGTATTGCT	GACCGCATGC	AAAAGGAGAT	CACAGCCCCTG
Oca	CCATGTACCC	AGGTATTGCT	GACCGCATGC	AAAAGGAGAT	CACAGCCCCTG
	751		ActD →		800
Pollo	GCCCCAGCA	CAATGAAGAT	CAAGgtaagg	ctcgagtgtc	aaggacctgt
Cerdo	GCGCCAGCA	CCATGAAGAT	CAAGgtgagt	cgggtggccg	tggggtcggc
Pato	GCCCCAGCA	CAATGAAGAT	CAAGgtaagg	ctacagcgta	acggatccag
Oca	GCCCCAGCA	CAATGAAGAT	CAAGgtaagg	ccagagcgta	acggagccag
	801				850
Pollo	acacacgtct	ccaggagcag	ccttctctgg	tcctcctgtg	aacattgcat
Cerdo	aggcggcctt	gctgggaccc	aggccttggc	tgccggag..
Pato	gcacaggtct	ccgagcacag	ccttcttttt	gccttctgtc	agcg.....
Oca	gcacaggtct	ctggggacag	ccttctttt.	gcccctcatgc	ggcgctgac
				ActG →	

Figura 40. (continuación)

	851	ActC →			900
Pollo	ggggcagtgt	gtaccccgtg	acacctgtgg	tggctgcaag	tgtgctgatc
Cerdoactg
Pato	.cctgcagca	tttac.....g	tgcactgatc
Oca	acctgcagca	tttac.....g	tgcactgatc
	901				950
Pollo	ttgtctcttc	ttggccttcc	tagATCATTG	CCCCACCTGA	GCGCAAGTAC
Cerdo	aagtcccgcc	cttgtctccc	cagATCATCG	CGCCTCCCGA	GCGCAAGTAC
Pato	tcactctctct	cggttttttc	tagATCATCG	CCCCGCCTGA	GCGCAAGTAC
Oca	tcactctctct	tggttttttc	tagATCATCG	CCCCCCTGA	GCGCAAGTAC
	951				1.000
Pollo	TCTGTCTGGA	TCGGTGGCTC	CATCTTGGCC	TCCCTGTCCA	CCTTCCAG <u>CA</u>
Cerdo	TCTGTGTGGA	TCGGTGGCTC	CATCCTGGCC	TCGCTGTCCA	CCTTCCAG <u>CA</u>
Pato	TCCGTCTGGA	TCGGTGGCTC	CATCCTGGCC	TCCCTGTCCA	CCTTCCAG <u>CA</u>
Oca	TCTGTCTGGA	TCGGTGGCTC	CATCCTGGCC	TCCCTGTCCA	CCTTCCAG <u>CA</u>
	1.001	← Act4		1.021	
Pollo	<u>GATGTGGATC</u>	<u>ACCAAGCAGG</u>		A	
Cerdo	<u>GATGTGGATC</u>	<u>ACCAAGCAGG</u>		A	
Pato	<u>GATGTGGATC</u>	<u>ACCAAGCAGG</u>		A	
Oca	<u>GATGTGGATC</u>	<u>ACCAAGCAGG</u>		A	
		← actinv			

Pollo	YLMKILTERG	YSFVTTAERE	IVRDIKEKLC	YVALDFENEM
Oca
Pato mulard
CerdoT.....Q..
Pollo	ATAASSSSLE	KSYELPDGQV	ITIGNERFRC	PETLFQPSFI
Oca
Pato mulard
CerdoA.....L
Pollo	GMESAGIHET	TYNNSIMKCD	IDIRKDLYAN	NVMSGGTTMY
Oca
Pato mulardT.....
CerdoC.....	.F.....	V.....	T.L.....
Pollo	PGIADRMQKE	ITALAPSTMK	IKIIAPPERK	YSVWIGGSIL
Oca
Pato mulard
Cerdo
Pollo	ASLSTFQQMW	ITKQ		
Oca		
Pato mulard		
Cerdo		

Figura 41. Secuencias aminoacídicas correspondientes a los exones comprendidos en los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos Act2 y Act4 a partir de muestras de oca, pato, pollo y cerdo. Los puntos representan identidad con la secuencia superior.

oca, pollo y pavo. Con estos mismos cebadores se obtuvo una banda de aproximadamente 315 pb en el ADN de cerdo, que no corresponde al gen α -actina y no interfiere en la interpretación del resultado.

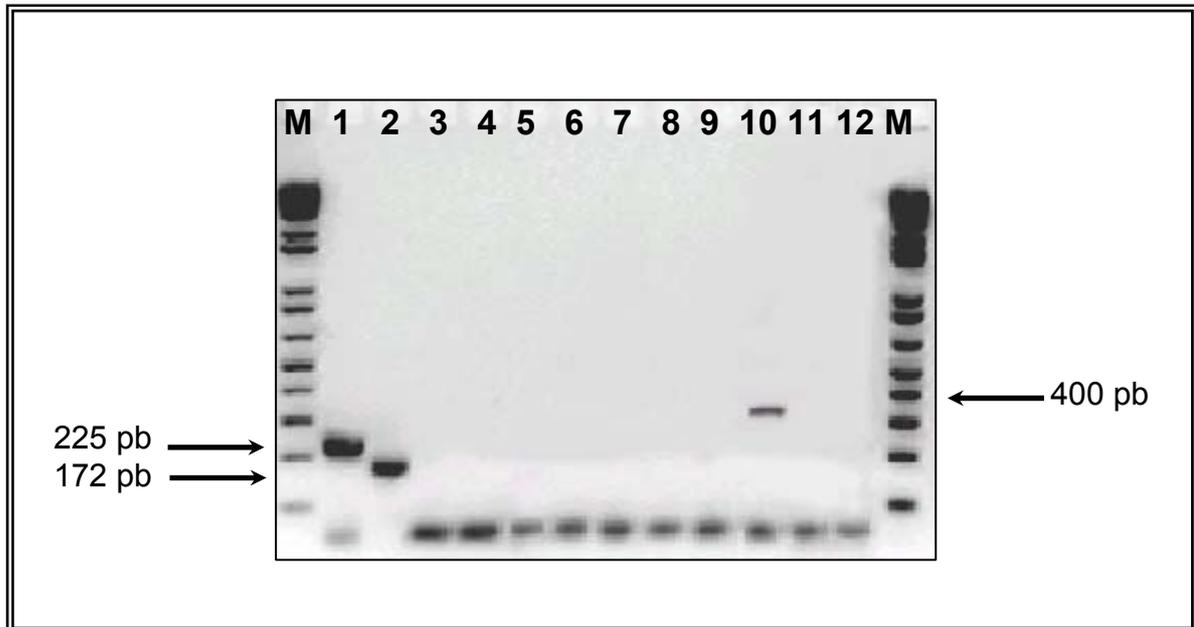


Figura 42. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen α -actina amplificados con los cebadores ActD/actinv (líneas 1, 8-12) y ActG/actinv (líneas 2-7). Muestras: pato mulard (1, 3), oca (2, 8), pollo (4, 9), cerdo (5, 10), pavo (6, 11) y control negativo (7, 12). (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

El cebador ActC, junto con el cebador inverso actinv, amplificó un fragmento de 154 pb en el pollo y no se obtuvo amplificación en las muestras de ADN de oca, pato mulard y cerdo. Finalmente, el cebador ActP, junto con el cebador inverso actinv, amplificó un fragmento de 392 pb en el cerdo, mientras que no se obtuvo amplificación en las muestras de ADN de oca, pato y pollo (Figura 43).

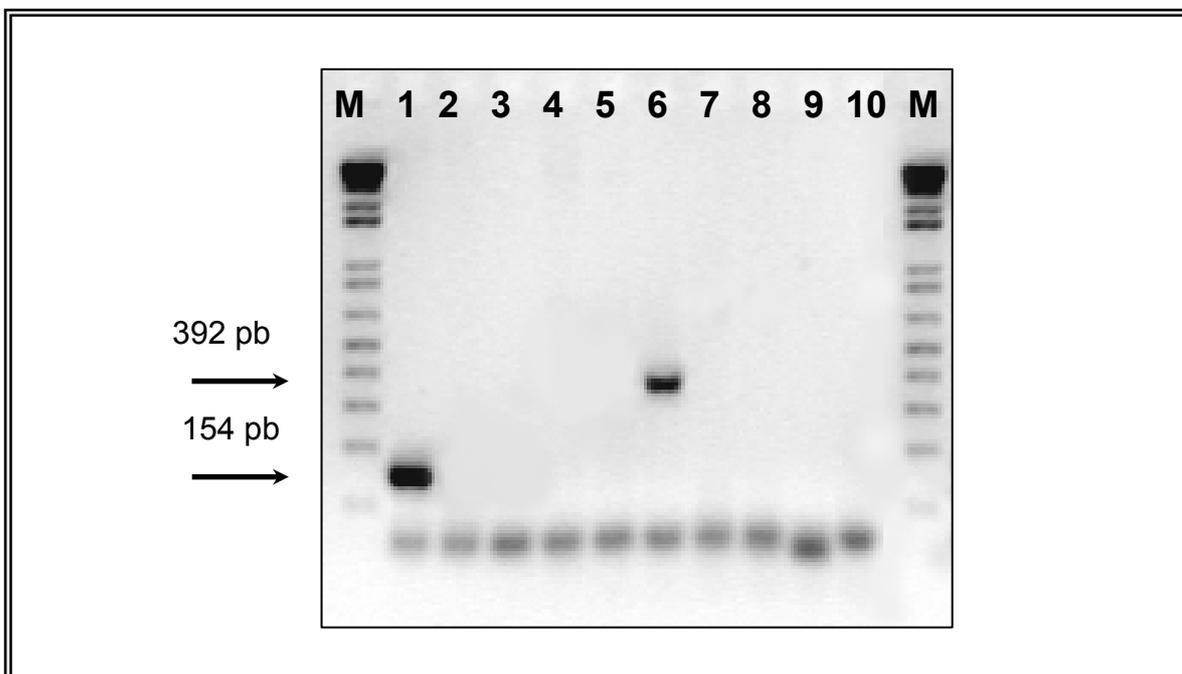


Figura 43. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen α -actina amplificados con los cebadores ActC/actinv (líneas 1-5) y ActP/actinv (líneas 6-10). Muestras: pollo (1, 9), pato mulard (2, 7), oca (3, 8), cerdo (4, 6) y control negativo (5, 10). (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

IV.1.3.2.3. Determinación del límite de detección

El límite de detección del método se determinó mediante la amplificación por PCR del ADN obtenido a partir de mezclas binarias experimentales que contenían un 100, 50, 25, 10, 5, 1 y 0,1% de la especie diana. Las Figuras 44, 45 y 46 muestran como en todas las especies, a medida que el porcentaje de la especie diana se reduce en la mezcla, se obtiene una banda de amplificación menos intensa con los cebadores específicos de especie.

El límite de detección del ensayo (porcentaje más pequeño que produce una amplificación visible de ADN) fue igual o inferior al 1% para todas las especies analizadas en las mezclas (Figuras 44, 45 y 46). Además, se determinó un límite de detección del 0,1% en las mezclas de hígado de pollo en pato u oca (Figuras 45A y 45B) y en las mezclas de hígado de cerdo en pato u oca (Figuras 46A y 46B). El límite de detección no se modificó cuando se analizaron muestras pasteurizadas (Figura 44B) o esterilizadas (Figura 44C). Al analizar muestras que contenían mezclas de varias especies tampoco se observaron productos de PCR inespecíficos o inhibición de la reacción.

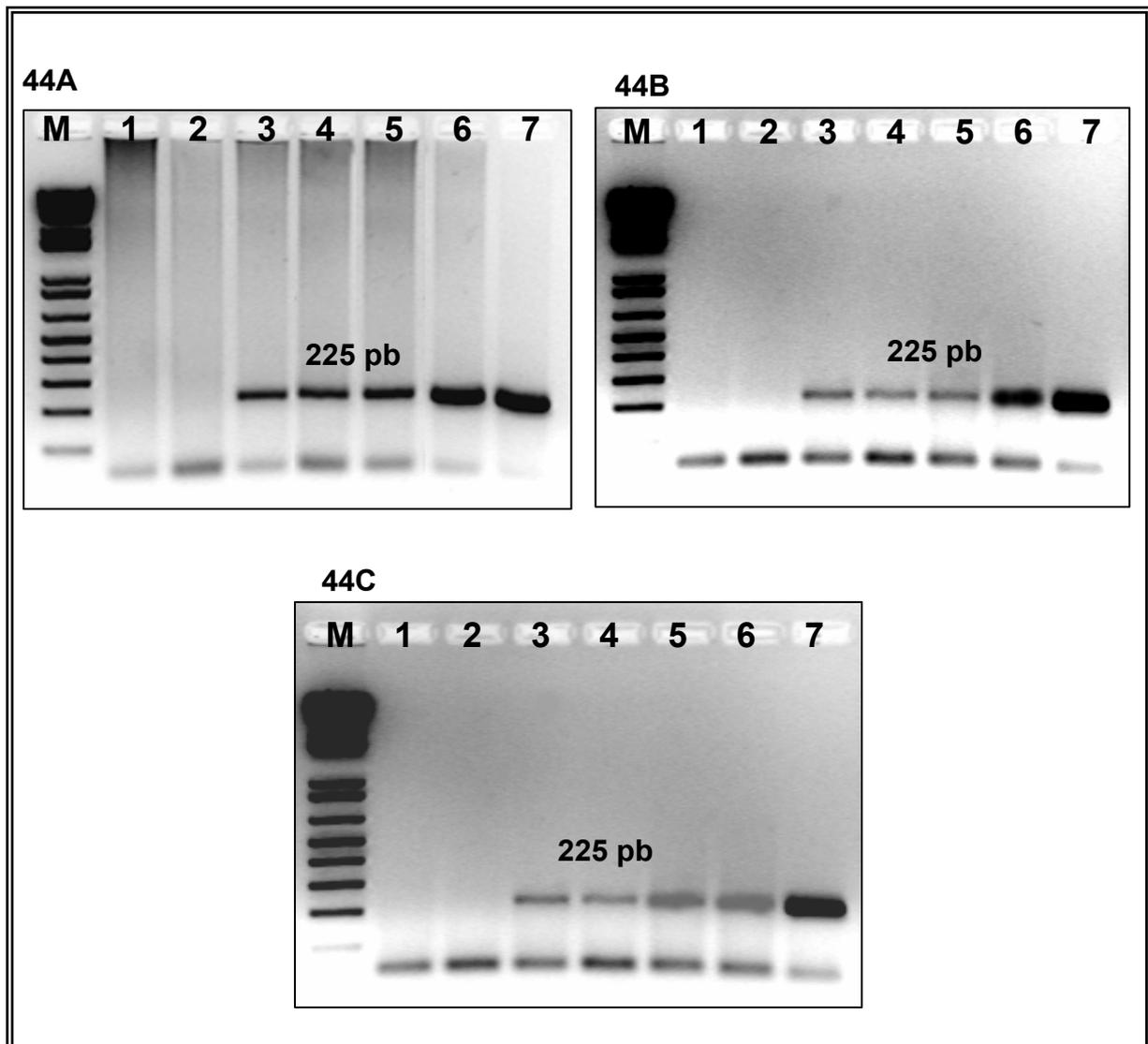


Figura 44. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen de la α -actina amplificados con los cebadores ActD y actinv a partir de mezclas binarias experimentales frescas (44A), pasteurizadas a 65°C/30 min (44B) y esterilizadas a 120°C/20 min (44C). Las líneas 1 a 7 en todas las imágenes electroforéticas son muestras de *foie gras* de oca que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y 100% de *foie gras* de pato. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

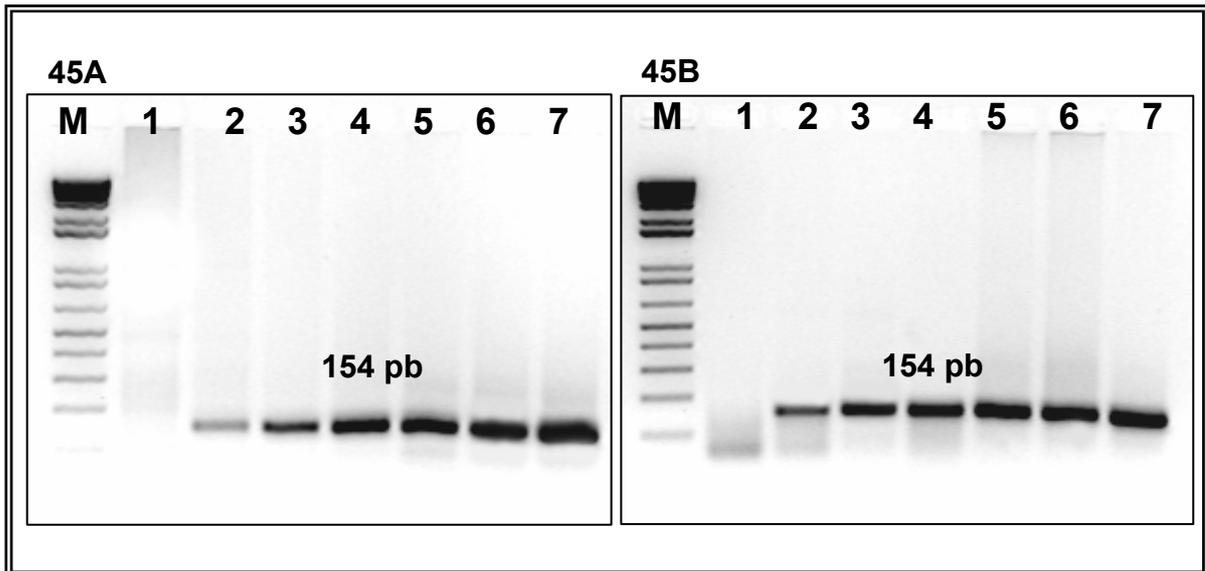


Figura 45. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen de la α -actina amplificados con los cebadores ActC y actinv a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 7 corresponden a mezclas experimentales de *foie gras* fresco de oca (45A) o *foie gras* fresco de pato mulard (45B) que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y 100% de hígado fresco de pollo. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

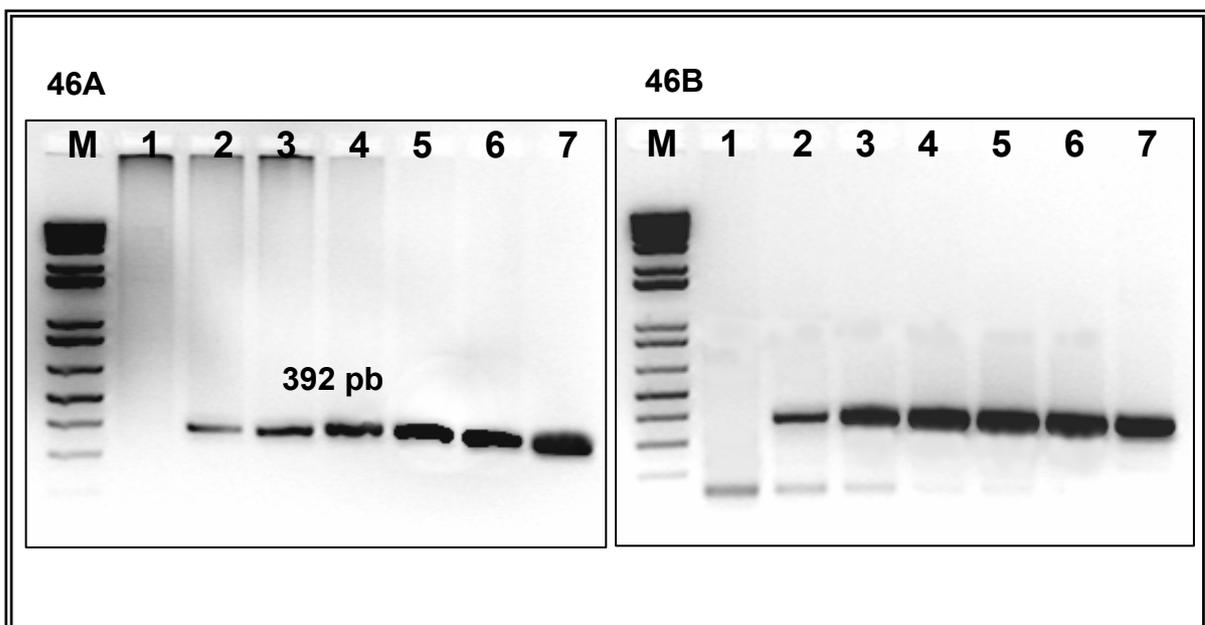


Figura 46. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen de la α -actina amplificados con los cebadores ActP y actinv a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 7 corresponden a mezclas experimentales de *foie gras* fresco de oca (46A) o *foie gras* fresco de pato mulard (46B) que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y 100% de hígado fresco de cerdo. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

IV.1.3.3. GEN 12S ARNr

IV.1.3.3.1. Amplificación por PCR y secuenciación

El análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos con los cebadores 12SFW y 12SREV (sección III.2.2.3.) permitió constatar la amplificación de un fragmento de ADN de 392 pb, 394 pb, 402 pb, 404 pb y 400 pb a partir de las muestras de oca, pato, pollo, cerdo y pavo (*Figura 47*).

Asimismo, la pareja de cebadores 12SFWM y 12SSEQ (sección III.2.2.3.) permitió la amplificación de un fragmento de 400 pb, 399 pb, 398 pb y 397 pb a partir de las muestras de cerdo, vaca, oveja y cabra (*Figura 48*).

Los productos de PCR obtenidos a partir de dos individuos de cada una de las especies de interés se purificaron según el protocolo descrito en la sección III.2.7.1 y se secuenciaron en el Centro de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid.

Los productos de PCR de oca, pato, pollo y pavo se secuenciaron utilizando los cebadores 12SFW y 12SREV, mientras que los de cerdo, vaca, oveja y cabra se secuenciaron utilizando los cebadores 12SFWM y 12SSEQ. Las secuencias directa e inversa se combinaron para obtener la secuencia completa de cada producto de PCR.

A continuación, las secuencias de los productos de PCR del gen mitocondrial 12S ARNr de oca, pato, pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra se compararon con otras existentes en la base de datos GenBank, cuyos números de acceso son U59666 (pato), X52392 (pollo), AJ002189 (cerdo), U83741 (pavo), J01394 (vaca), NC_001941 (oveja), y M55541 (cabra). En las bases de datos no se encontró ninguna secuencia del gen 12S ARNr de oca.

En la *Figura 49* se muestran, a modo de ejemplo, el cromatograma y la secuencia nucleotídica obtenidas en la secuenciación de un producto de PCR de pato con los cebadores 12SFW y 12SREV.

Las *Figuras 50 y 51* muestran las secuencias de los fragmentos del gen 12S ARNr amplificados a partir de ADN de oca, pato, pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra.

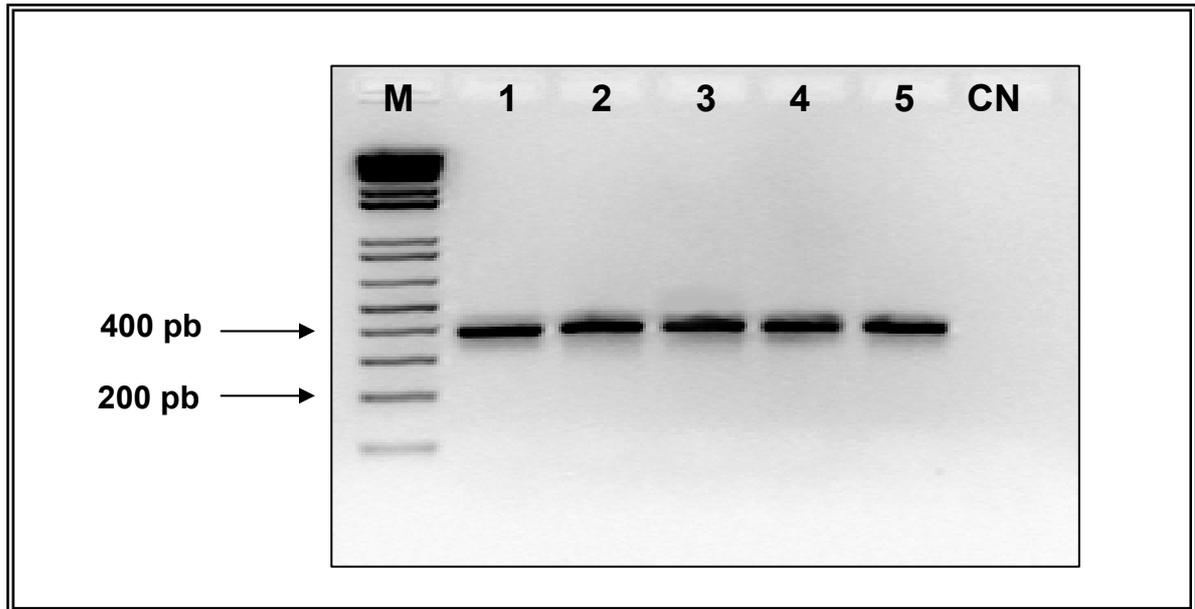


Figura 47. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr, amplificados con los cebadores 12SFW y 12SREV. Muestras: oca (1), pato mulard (2), pollo (3), pavo (4) y cerdo (5). (CN) corresponde al control negativo y (M) al marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

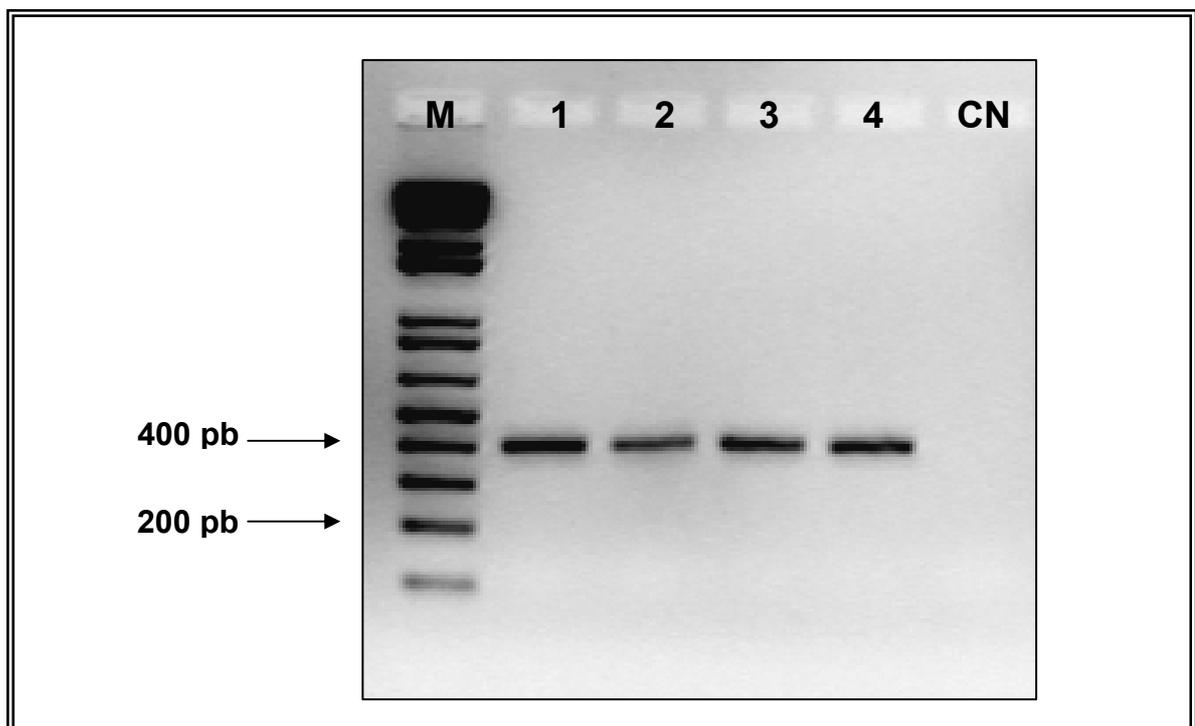


Figura 48. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr, amplificados con los cebadores 12SFWM y 12SSEQ. Muestras: cerdo (1), vaca (2), oveja (3) y cabra (4). (CN) corresponde al control negativo y (M) al marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

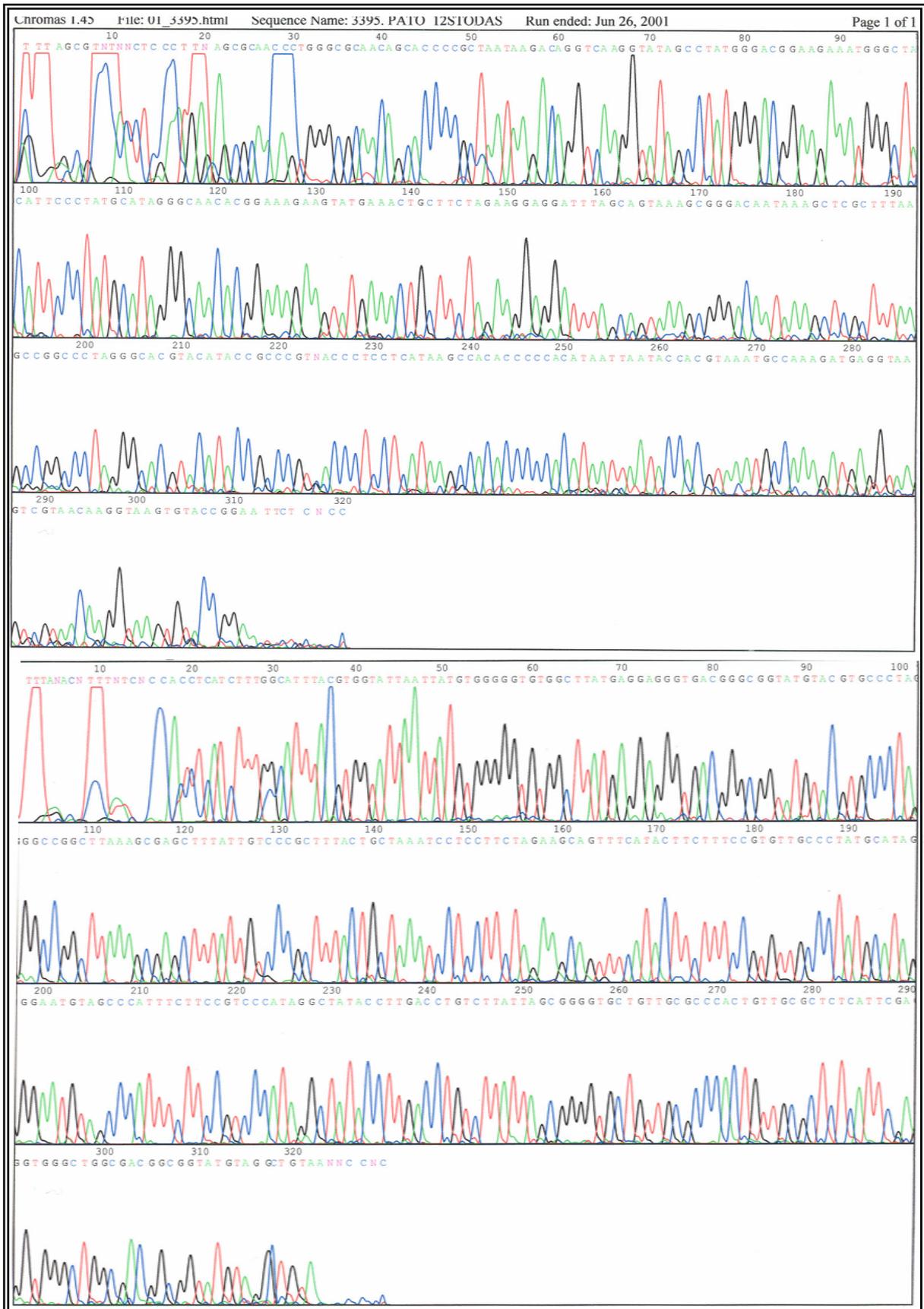


Figura 49. Cromatograma y secuencia de nucleótidos de un producto de PCR del gen 12S ARNr de pato, obtenidos utilizando los oligonucleótidos 12SFW y 12SREV como cebadores en la reacción de secuenciación.

Cebador 12SFW											
	1				50		251		300		
Oca	CCACCTAGAG	GAGCCTGTTT	TGTAATCGAT	AATCCCCGAT	TAACCCAACC	OcaGTAAA	GTGGGATAAT	A.....G	AGCCTACTTT	AAGCCGGCCC
Pato	CCACCTAGAG	GAGCCTGTTT	TGTAATCGAT	GATCCACGAT	CAACCCAACC	PatoGTAAA	GCGGGACAAT	A.....A	AGCTCGCTTT	AAGCCGGCCC
Pollo	CCACCTAGAG	GAGCCTGTTT	TATAATCGAT	AATCCACGAT	TCACCCAACC	PolloGTAAA	GTGAGATCAT	AC..CCCCTA	AGCTCACTTT	AAGACGGCTC
Pavo	CCACCTAGAG	GAGCCTGTTT	TGTAATCGAT	AATCCACGAT	CCACCCAACC	PavoGTAAA	GTAAGACCAT	ACTTCTCTTA	AGCCTACTTA	AAGACGGCCC
Cerdo	CCACCTAGAG	GAGCCTGTTT	TATAATCGAT	AAACCCCGAT	AGACCTTACC	Cerdo	GGAGGATTTA	GCAGTAAATC	AAGAATAGAG	TGCTTGATTG	AATAAGGCCA
	51				100		301				350
Oca	ACCCCTTGCC	AA.CACAGCC	TACATACCGC	CGTCGCCAGC	CCACCTCGAA	Oca	TGGGGCACGT	ACATACCGCC	CGTCACCCTC	CTCAAAAGCC	ACA.TCCCAC
Pato	GCCCTTGCC	AAGCACAGCC	TACATACCGC	CGTCGCCAGC	CCACCTCGAA	Pato	TAGGGCACGT	ACATACCGCC	CGTCACCCTC	CTCATAAGCC	ACACCCCCAC
Pollo	ACCCCTTGCC	AG.CACAGCC	TACATACCGC	CGTCGCCAGC	CCACCTCTAA	Pollo	TGAGGCACGT	ACATACCGCC	CGTCACCCTC	TCACAAGCC	ATCAACATCA
Pavo	ACCTCTTGCC	AA.CACAGCC	TACATACCGC	CGTCGCCAGC	CCACCTAAA	Pavo	TGGGGCACGT	ACATACCGCC	CGTCACCCTC	CTCACAAGCT	ATCAATTCA
Cerdo	AACCTTGCC	AA.TTCAGCC	TATATACCGC	CATCTTCAGC	AAACC.CT.A	Cerdo	TGAAGCACGC	ACACACCGCC	CGTCACCCTC	CTCAAGCATG	TAGTAATAAA
	101				150		351				400
Oca	TGAGAGCACA	ACAGTGAGCA	CAATAGCACC	CCGCTAATAA	GACAGGTCAA	Oca	ATAACTA..	ATAC...CAT	AAATACGCTG	AAGATGAGGT	AAGTCGTAAC
Pato	TGAGAGCGCA	ACAGTGGGCG	CAACAGCACC	CCGCTAATAA	GACAGGTCAA	Pato	ATAATTA..	ATAC...CAC	<u>GTAATGCCA</u>	AAGATGAGGT	AAGT.GTAAC
Pollo	TGAAAGAACA	ACAGTGAGCT	CAATAGCCCC	TCGCTAATAA	GACAGGTCAA	Pollo	ATAAATATAT	ACCT...CCC	CTCCCGGCTA	AAGACGAGGC	AAGTCGTAAC
Pavo	<u>TGAAAGATCA</u>	ATAGTGAGCT	CAATAGTCCC	.CACTAACAA	GACAGGTCAA	Pavo	ATAAATA..	ATAC...CCA	ACCCTAGCTA	AAGATGAGGT	AAGTCGTAAC
Cerdo	AAAAGGAACA	ATAGTAAGCA	CAATCATAGC	ACATAAAAAA	GTTAGGTCAA	Cerdo	AATAACCTAT	ATTCAATTAC	ACAACCATGC	AAGAAGAGAC	AAGTCGTAAC
	151				200		401		417		
Oca	GGTATAGCCT	ATGGAGTGG.	AAGAAATGGG	CTACATTCCC	TATTCATAGG	Oca	AAGGTAAGTG	TACCGGA			
Pato	GGTATAGCCT	ATGGGACGG.	AAGAAATGGG	CTACATTCCC	TATGCATAGG	Pato	AAGGTAAGTG	TACCGGA			
Pollo	GGTATAGCCT	ATGGGGTGG.	GAGAAATGGG	CTACATTTTC	TA.ACATAGA	Pollo	AAGGTAAGTG	TACCGGA			
Pavo	GGTATAGCCC	ATGAGGTGG.	AAGAAATGGG	CTACATTTTC	TA.ACATAGA	Pavo	AAGGTAAGCG	TACCGGA			
Cerdo	GGTGTAGCTT	ATGGGTGGA	AAGAAATGGG	CTACATTTTC	TACATAAGAA	Cerdo	AAGGTAAGCA	TACTGGA			
	201				250		Cebador 12SREV				
Oca	GCA.CACGGA	AAGAAGCGTG	<u>AAACCACTTC</u>	TGGAAGGCGG	ATTTAGCA..						
Pato	GCAACACGGA	AAGAAGTATG	AAACTGCTTC	TAGAAGGAGG	ATTTAGCA..						
Pollo	ACAAACGAAA	AAGGACGTGA	AACCCGCCCT	TAGAAGGAGG	ATTTAGCA..						
Pavo	ACAGACGAAA	AAGGGCGTGA	AACTCGCCCT	TGGAAGGAGG	ATTTAGCA..						
Cerdo	TATCCA....CCACAC	GAAAGTTTTT	ATGAAA..CT	AAAAACCAA						

Figura 50. Secuencias de ADN correspondientes a los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos 12SFW y 12SREV a partir de muestras de oca, pato, pollo, pavo y cerdo. Los cebadores 12SFW (directo) y 12SREV (inverso) se indican en negrita. Los cebadores específicos 12SG (oca), 12SD (pato), 12SC (pollo), 12ST (pavo) y 12SP (cerdo) aparecen subrayados.

	1				Cebador 12SFWM				50					251				300				
Cerdo	CTAGAGGAGC	CTGTTCTATA	ATCGATAAAC	CCCGATAGAC	CTTACCAACC								Cerdo	AATCAAGAAT	AGAGTGCTTG	ATTGAATAAG	GCCATGAAGC	ACGCACACAC				
Vaca	CTAGAGGAGC	CTGTTCTATA	ATCGATAAAC	CCCGATAAAC	CTCACCAATT								Vaca	AACTAAGAAT	AGAGTGCTTA	GTTGAATTAG	GCCATGAAGC	ACGCACACAC				
Cabra	CTAGAGGAGC	CTGTTCTATA	ATCGATAAAC	CCCGATAAAC	CTCACCAATC								Cabra	AACTAAGAAT	AGAGTGCTTA	GTTGAATTAG	GCCATGAAGC	ACGCACACAC				
Oveja	CTAGAGGAGC	CTGTTCTATA	ATCGATAAAC	CCCGATAAAC	CTCACCAATC								Oveja	AACTAAGAAT	AGAGTGCTTA	GTTGAATCAG	GCCATGAAGC	ACGCACACAC				
	51				100					301				350								
Cerdo	CTTGCCAATT	CAGCCTATAT	ACCGCCATCT	TCAGCAAACC	CT.AAAAAGG								Cerdo	CGCCCCTCAC	CCTCCTCAAG	CATGTAGTAA	TAAAAATAAC	CTATATTCAA				
Vaca	CTTGCTAATA	CAGTCTATAT	ACCGCCATCT	TCAGCAAACC	CT.AAAAAGG								Vaca	CGCCCCTCAC	CCTCCTCAA	TAGATTCAGT	GCATCTTAAC	CCTATTTAAA				
Cabra	CTTGCTAATA	CAGTCTATAT	ACCGCCATCT	TCAGCAAACC	CT.AAAAAGG								Cabra	CGCCCCTCAC	CCTCCTCAAG	TAAATACAAT	GCA.CTCAAG	CCTATTAACA				
Oveja	CTTGCTAATA	CAGTCTATAT	ACCGCCATCT	TCAGCAAACC	CTAAAAAAGG								Oveja	CGCCCCTCAC	CCTCCTCAAG	TAAATATGAT	ATA.CTAAA	CCTATTTACA				
	101				150					351				400								
Cerdo	AACAATAGTA	AGCACAATCA	TAGCACATAA	AAACGTTAGG	TCAAGGTGTA								Cerdo	TTACACAACC	ATGCAAGAAG	AGACAAGTCG	TAACAAGGTA	AGCATACTGG				
Vaca	AAAAAAAGTA	AGCGTAATTA	TGATACATAA	AAACGTTAGG	TCAAGGTGTA								Vaca	CGCACTAGCT	ACATGAGAGG	AGACAAGTCG	TAACAAGGTA	AGCATACTGG				
Cabra	AACAAAAGTA	AGCTCAATCA	CAACACATAA	AGACGTTAGG	TCAAGGTGTA								Cabra	CGCATCAACT	ACATGAGAGG	AGATAAGTCG	TAACAAGGTA	AGCATACTGG				
Oveja	GACAAAAGTA	AGCTCAATAA	TAACACATAA	AGACGTTAGG	TCAAGGTGTA								Oveja	<u>TATATCAACC</u>	<u>ACACGAGAGG</u>	<u>AGACAAGTCG</u>	TAACAAGGTA	AGCATACTGG				
	151				200					401				Cebador 12SSEQ								
Cerdo	GCTTATGGGT	TGGAAAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTACATA	AGAATATCCA								Cerdo	A								
Vaca	ACCTATGAAA	TGGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TCTCTACACC	AAGAGAATCA								Vaca	A								
Cabra	ACCCATGGAA	TGGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTACCTT	AAGAAAATTA								Cabra	A								
Oveja	ACCTATGGAG	TGGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTACCCA	AGAAAATTTA								Oveja	A								
	201				250																	
Cerdo	CCACACGAAA	GTTTTTATGA	AACTAAAAAC	CAAAGGAGGA	TTTAGCAGTA																	
Vaca	<u>.AGCACGAAA</u>	GTTATTATGA	AACCAATAAC	CAAAGGAGGA	TTTAGCAGTA																	
Cabra	<u>.A.TACGAAA</u>	GCCATTATGA	AATTAATGAC	CAAAGGAGGA	TTTAGTAGTA																	
Oveja	<u>.A.TACGAAA</u>	GCCATTATGA	AATTAATAGC	CAAAGGAGGA	TTTAGCAGTA																	

Figura 51. Secuencias de ADN correspondientes a los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos 12SFWM y 12SSEQ a partir de muestras de cerdo, vaca, oveja y cabra. Los cebadores 12SFWM (directo) y 12SSEQ (inverso) se indican en negrita. Los cebadores inversos específicos 12SP (cerdo), 12SBT (vaca), 12SOA (oveja) y 12SCH (cabra) aparecen subrayados.

Las secuencias de los fragmentos del gen 12S ARNr amplificadas a partir de ADN de pollo, pato, pavo, oca y cerdo se han registrado en la base de datos GenBank/EMBL con los números de acceso AJ583547 (pollo), AJ583548 (pato), AJ583549 (pavo), AJ583550 (oca) y AJ583551 (cerdo).

IV.1.3.3.2. Diseño de cebadores específicos y amplificación de fragmentos específicos de especie

Mediante los programas PILEUP y PRETTY del paquete informático GCG, se alinearon y construyeron secuencias consenso a partir de las secuencias del gen 12S ARNr obtenidas en los individuos de oca, pato, pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra (*Figuras 50 y 51*). A continuación, utilizando el programa PRIMER EXPRESS® (Applied Biosystems), se diseñó un cebador inverso específico para cada una de las especies de interés (oca, pato, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra) que permitiera la identificación del origen específico de muestras problema.

IV.1.3.3.2.1. Cebadores 12SFW, 12SG, 12SD, 12SC, 12ST y 12SP

La especificidad de los cebadores de oca (12SG), pato mulard (12SD), pollo (12SC), pavo (12ST) y cerdo (12SS) diseñados para hibridar específicamente en las secuencias del gen 12S ARNr se confirmó mediante la amplificación por PCR del ADN genómico de diversas especies de aves y mamíferos.

La pareja de cebadores 12SFW/12SG, amplificó un fragmento de 244 pb en la oca, mientras que no se obtuvo amplificación en las muestras de ADN de pollo, cerdo, pavo y pato. Los cebadores 12SFW/12SD, amplificaron un fragmento de 373 pb en el pato, y no produjeron amplificación en las muestras de ADN de pollo, cerdo, pavo y oca. Los cebadores 12SFW/12SC, amplificaron un fragmento de 285 pb en el pollo, pero no se obtuvo amplificación en las muestras de ADN de cerdo, pavo, pato y oca. Los cebadores 12SFW/12SS, amplificaron un fragmento de 387 pb en el cerdo, sin producir amplificación en las muestras de ADN de pollo, pavo, pato y oca. Finalmente, el cebador 12ST, junto con el cebador directo 12SFW, amplificó un fragmento de 122 pb en el pavo, mientras que no se obtuvo amplificación en las muestras de ADN de pollo, cerdo, pato y oca (*Figura 52*). No se detectaron reacciones cruzadas cuando los cebadores específicos se enfrentaron con ADN de otras especies como vaca, oveja, cabra, caballo y conejo.

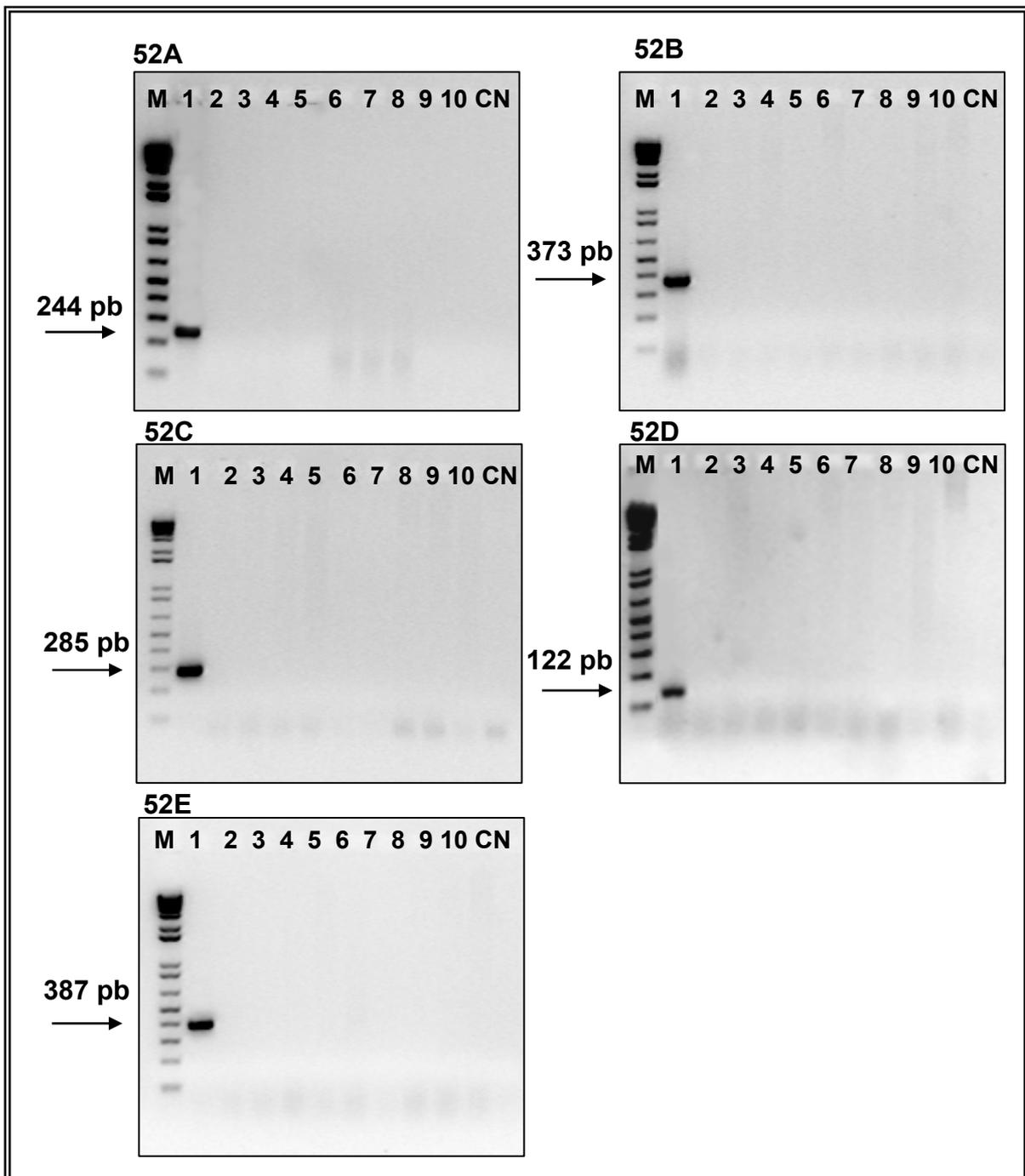


Figura 52. Análisis electroforético de los productos de PCR específicos del gen 12S ARNr. **52A)** Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SG a partir de ADN de oca (1), pato (2), pollo (3), pavo (4) y cerdo (5). **52B)** Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SD a partir de ADN de pato (1), oca (2), pollo (3), pavo (4) y cerdo (5). **52C)** Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SC a partir de ADN de pollo (1), pato (2), oca (3), pavo (4) y cerdo (5). **52D)** Amplificación con los cebadores 12SFW y 12ST a partir de ADN de pavo (1), pato (2), pollo (3), oca (4) y cerdo (5). **52E)** Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SS a partir de ADN de cerdo (1), pato (2), pollo (3), pavo (4) y oca (5). En todas las figuras, las líneas 6, 7, 8, 9 y 10 corresponden a muestras de vaca, oveja, cabra, conejo y caballo, respectivamente. (CN) corresponde al control negativo y (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

IV.1.3.3.2.2. Cebadores 12SFWM, 12SBT, 12SOA, 12SCH y 12SP

La especificidad de los cebadores diseñados frente a cerdo (12SP), vaca (12SBT), oveja (12SOA) y cabra (12SCH) se confirmó mediante la amplificación por PCR del ADN genómico de distintas especies de mamíferos y aves. El cebador 12SS, junto con el cebador directo 12SFWM, amplificó un fragmento de 383 pb en el cerdo, mientras que no se obtuvo amplificación en las muestras de ADN de vaca, oveja y cabra. El cebador 12SBT, junto con el cebador directo 12SFWM, amplificó un fragmento de 223 pb en la vaca, pero no produjo amplificación en las muestras de ADN de cerdo, oveja y cabra. El cebador 12SOA, junto con el cebador directo 12SFWM, amplificó un fragmento de 371 pb en la oveja, sin producir amplificación en las muestras de ADN de vaca, cerdo y cabra. El cebador 12SCH, junto con el cebador directo 12SFWM, amplificó un fragmento de 142 pb en la cabra, y no produjo amplificación en las muestras de ADN de vaca, oveja y cerdo (*Figura 53*).

El resultado obtenido fue el mismo independientemente del tratamiento térmico de las muestras (frescas, pasteurizadas y esterilizadas). No se detectaron reacciones cruzadas cuando los cebadores específicos se enfrentaron con ADN de otras especies como oca, pato, pollo, caballo y conejo.

IV.1.3.3.3. Determinación del límite de detección en mezclas binarias experimentales

IV.1.3.3.3.1. Mezclas binarias experimentales de oca, pato, pollo, pavo y cerdo

El límite de detección del método se determinó mediante la amplificación por PCR del ADN obtenido a partir de mezclas binarias que contenían un 100, 50, 25, 10, 5, 1 y 0,1% de la especie diana. Las *Figuras 54-57* muestran como a medida que el porcentaje de pollo (*Figura 54*), cerdo (*Figura 55*), pavo (*Figura 56*) o pato (*Figura 57*) se reduce en la mezcla, se obtienen bandas de amplificación menos intensas con los cebadores específicos de especie. El límite de detección del ensayo (porcentaje más pequeño que produce una amplificación visible de ADN) fue del 1% o incluso inferior para todas las especies analizadas en las mezclas. Además, se determinó un límite de detección del 0,1% en las mezclas de hígado de pollo en pato u oca (*Figuras 54A y 54B*) y en las mezclas de hígado de cerdo en pato u oca (*Figuras 55A y 55B*). El límite de detección no se modificó cuando se analizaron muestras pasteurizadas (*Figura 54C*) o esterilizadas (*Figura 54D*).

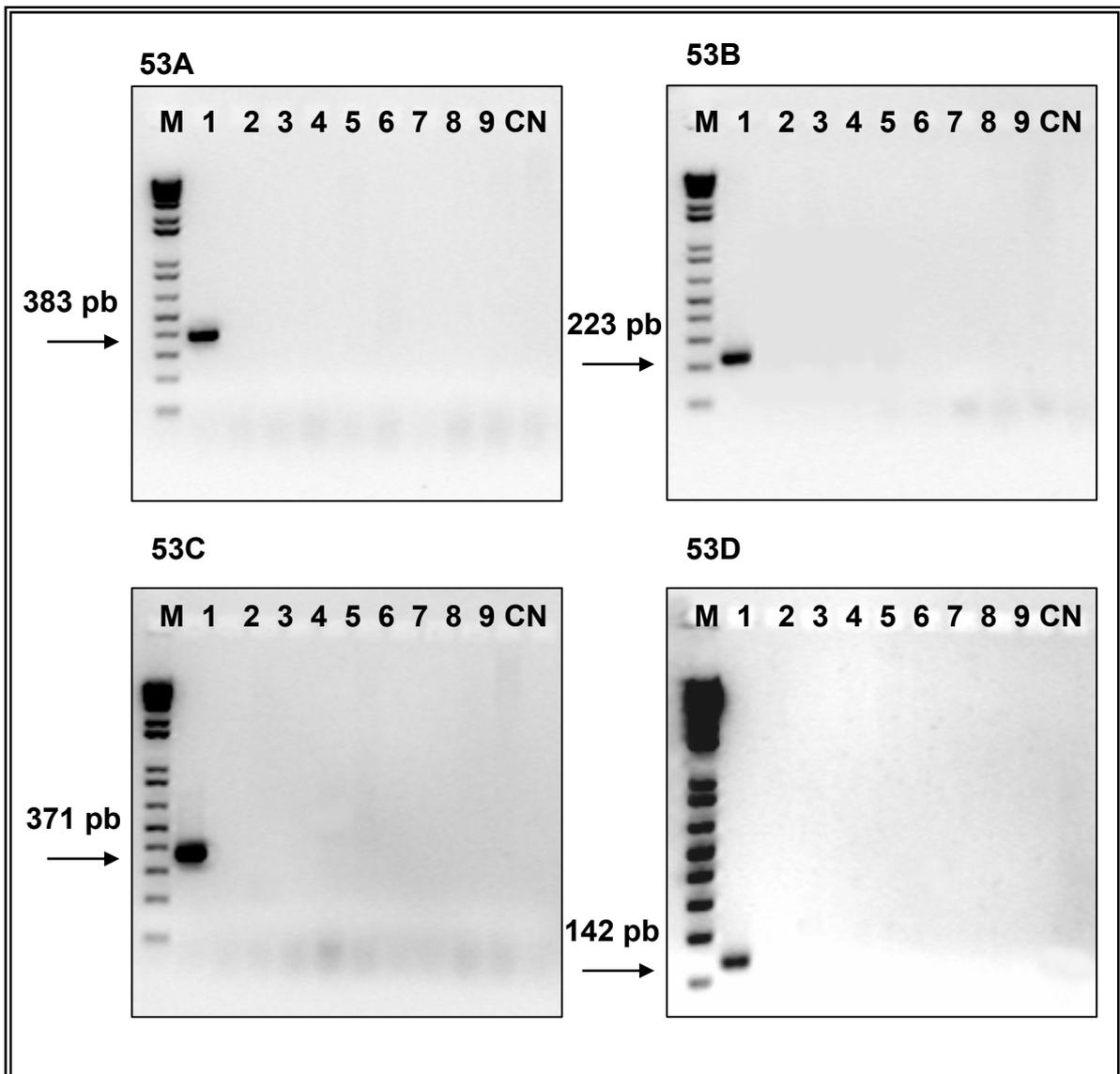


Figura 53. Análisis electroforético de los productos de PCR específicos del gen 12S ARNr. **53A)** Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SS a partir de ADN de cerdo (1), vaca (2), oveja (3) y cabra (4). **53B)** Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SBT a partir de ADN de vaca (1), cerdo (2), oveja (3) y cabra (4). **53C)** Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SOA a partir de ADN de oveja (1), vaca (2), cerdo (3) y cabra (4). **53D)** Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SCH a partir de ADN de cabra (1), vaca (2), oveja (3) y cerdo (4). En todas las figuras, las líneas 5, 6, 7, 8 y 9 corresponden a muestras de oca, pato, pollo, caballo y conejo, respectivamente. (CN) corresponde al control negativo y (M) marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*.

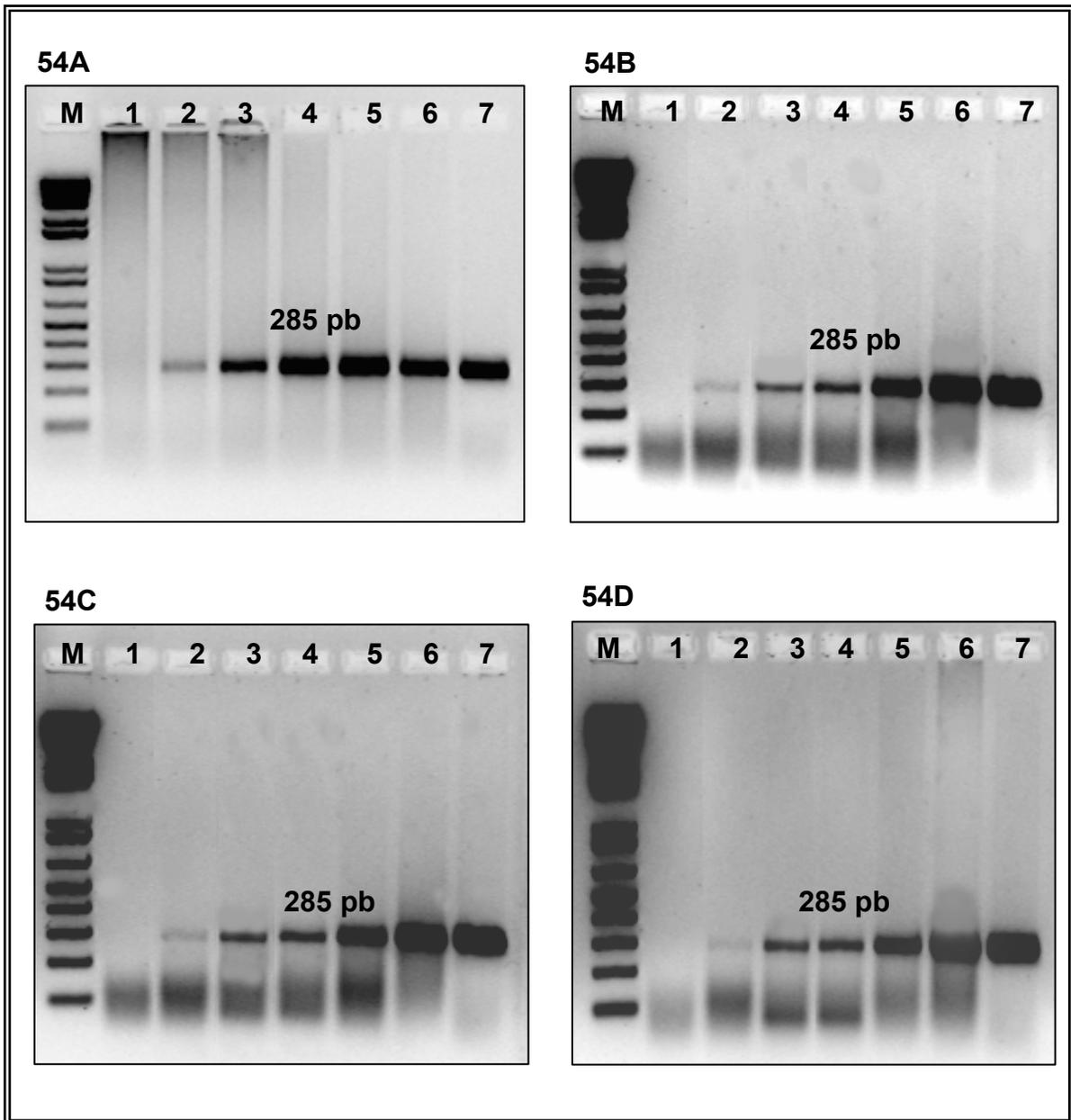


Figura 54. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFW y 12SC a partir de mezclas binarias experimentales frescas (54A y 54B), pasteurizadas (54C) o esterilizadas (54D). Las líneas 1 a 7 son muestras de *foie gras* fresco de oca (54A) o *foie gras* de pato mulard (54B-D), que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y un 100% de hígado de pollo. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

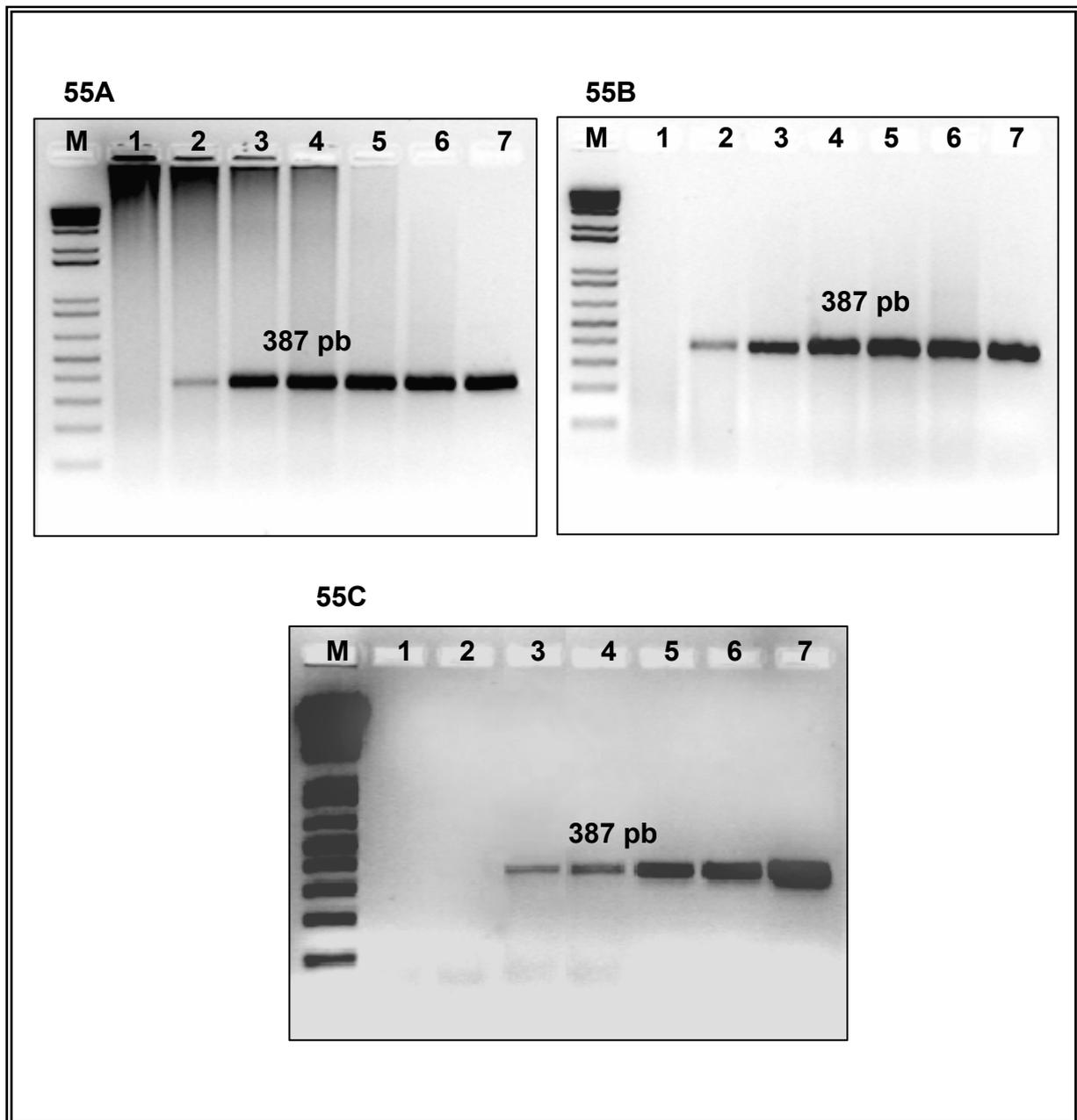


Figura 55. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFW y 12SS a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 7 son muestras de la segunda especie de la mezcla, que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y un 100% de cerdo, respectivamente. **55A)** hígado de cerdo en *foie gras* fresco de oca. **55B)** hígado de cerdo en *foie gras* fresco de pato mulard. **55C)** grasa de cerdo en *foie gras* fresco de oca. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

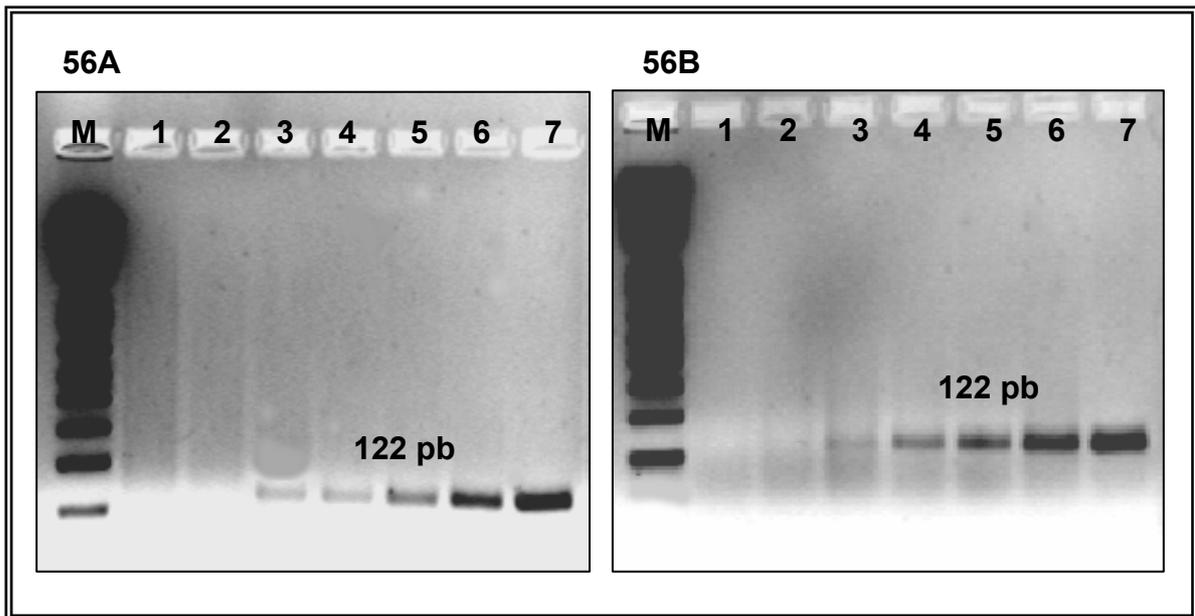


Figura 56. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFW y 12ST a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 7 son muestras de *foie gras* fresco de oca (56A) y *foie gras* fresco de pato mulard (56B), que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y un 100% de músculo de pavo. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

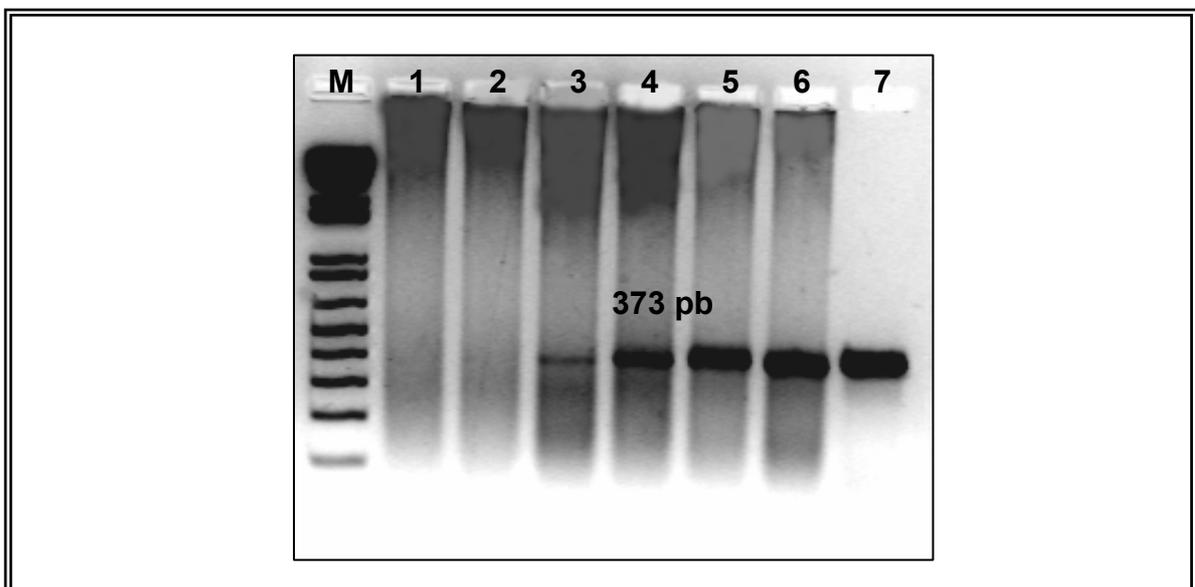


Figura 57. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFW y 12SD a partir de mezclas binarias pato/oca. Las líneas 1 a 7 son muestras de *foie gras* de oca, que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y un 100% de *foie gras* fresco de pato mulard. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

IV.1.3.3.3.2. Mezclas binarias experimentales de vaca, oveja, cabra y cerdo

El límite de detección del método se determinó mediante la amplificación por PCR de ADN obtenido de mezclas binarias que contenían un 100, 10, 5, y 1% de la especie diana. La Figuras 58-61 muestran como a medida que el porcentaje de cabra (Figura 58), vaca (Figura 59), cerdo (Figura 60) u oveja (Figura 61) se reduce en la mezcla, se obtienen bandas de amplificación menos intensas con los cebadores específicos de especie. El límite de detección del ensayo (porcentaje más pequeño que produce una amplificación visible de ADN) fue al menos del 1% para todas las especies analizadas en las mezclas (Figuras 58-61). El límite de detección no se modificó cuando se analizaron muestras pasteurizadas (Figuras 59B y 60B) o esterilizadas (Figuras 59C y 60C).

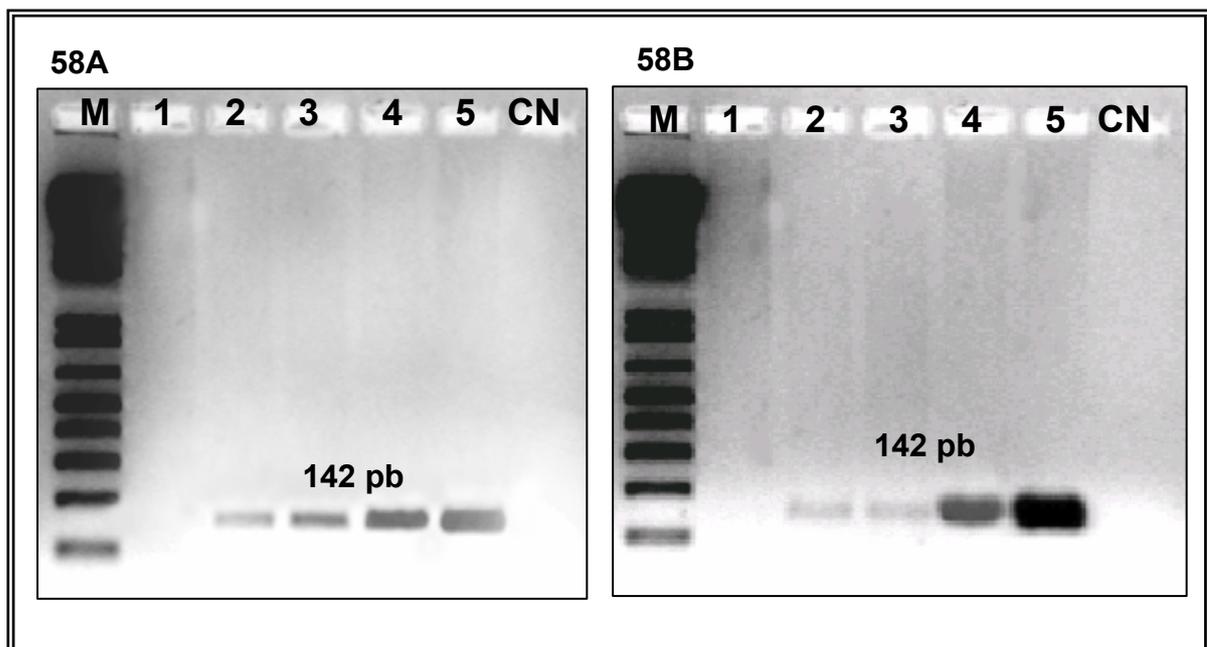


Figura 58. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFWM y 12SCH a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 5 son muestras de músculo fresco (58A) o grasa (58B) de cerdo, que contienen un 0; 1; 5; 10 y un 100% de músculo fresco de cabra. CN= control negativo. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

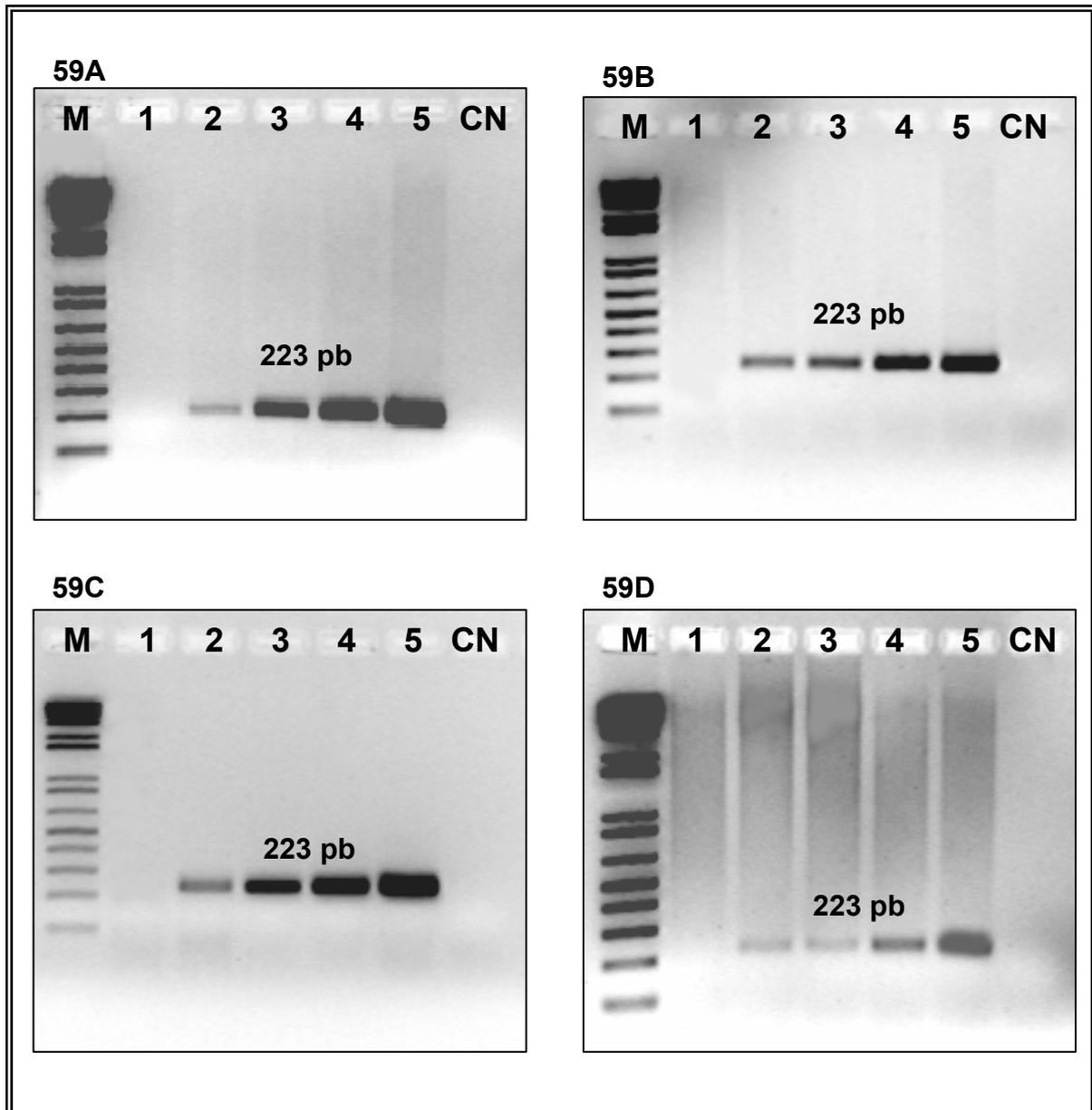


Figura 59. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFWM y 12SBT a partir de mezclas binarias experimentales de vaca/cerdo. Las líneas 1 a 5 son muestras de la segunda especie de la mezcla, que contienen un 0; 1; 5; 10 y un 100% de vaca, respectivamente. **59A)** músculo fresco de vaca en músculo de cerdo. **59B)** músculo pasteurizado de vaca en músculo de cerdo. **59C)** músculo esterilizado de vaca en músculo de cerdo. **59D)** músculo fresco de vaca en grasa de cerdo. CN= control negativo. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

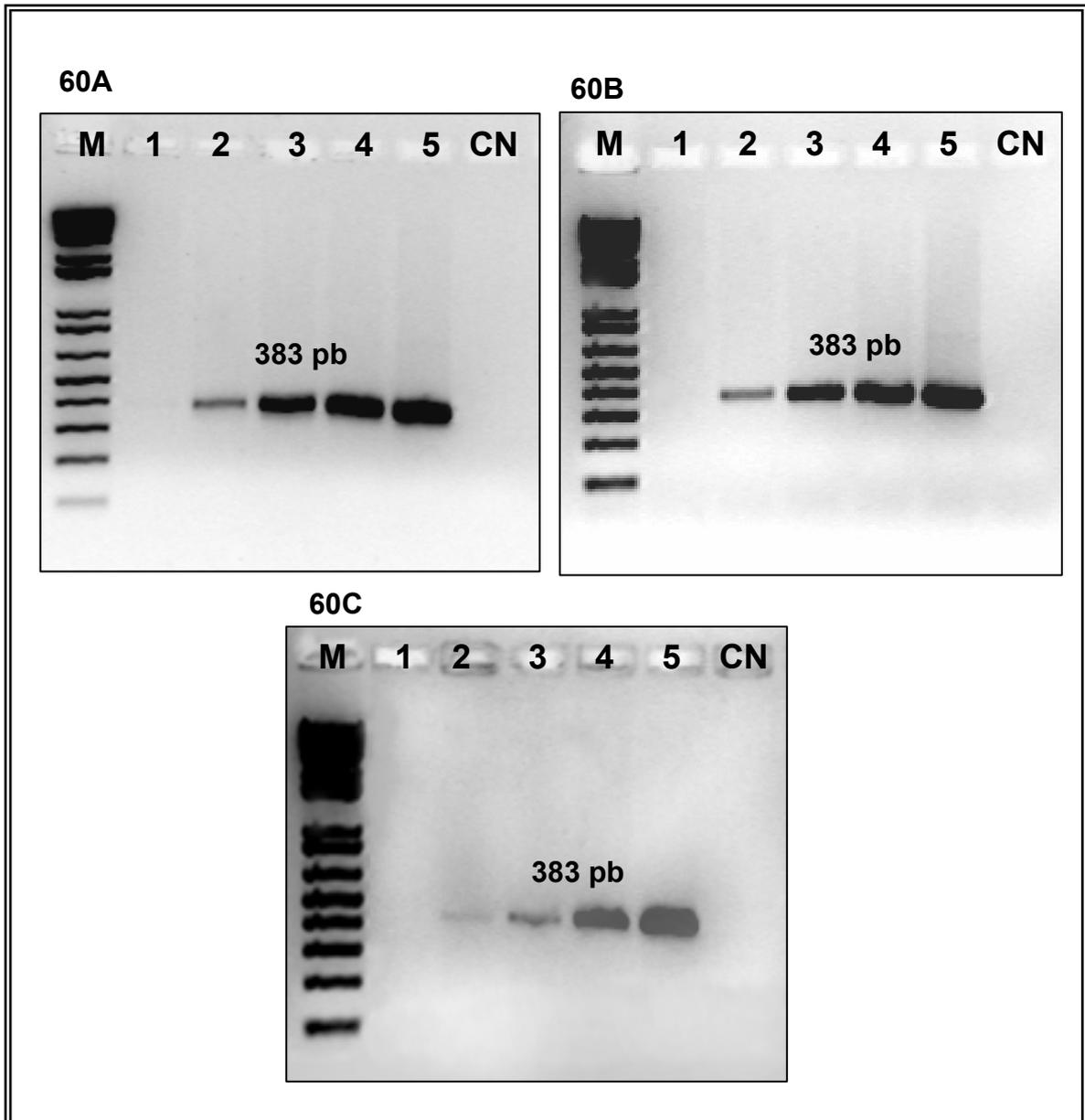


Figura 60. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFWM y 12SS a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 5 son muestras de músculo de vaca, que contienen un 0; 1; 5; 10 y un 100% de músculo de cerdo. **60A)** músculo fresco de cerdo en músculo de vaca. **60B)** músculo pasteurizado de cerdo en músculo de vaca. **60C)** músculo esterilizado de cerdo en músculo de vaca. CN= control negativo. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

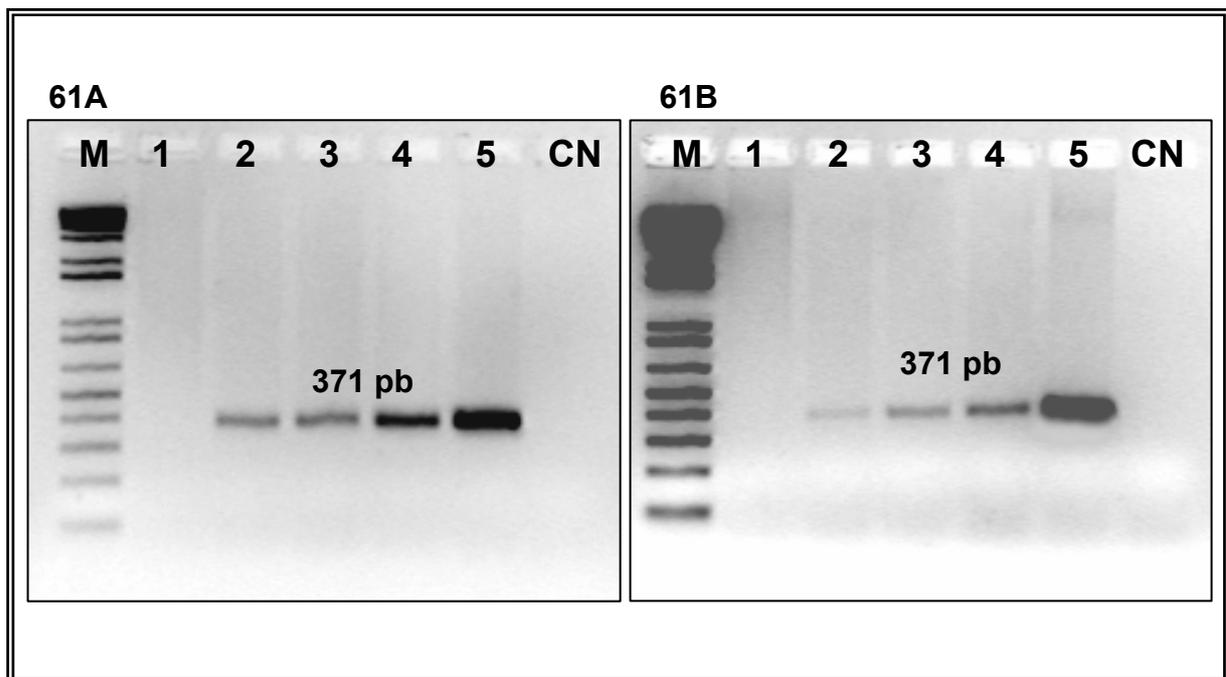


Figura 61. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFWM y 12SOA a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 5 son muestras de músculo fresco (61A) o grasa (61B) de cerdo, que contienen un 0; 1; 5; 10 y un 100% de músculo fresco de oveja. CN= control negativo. (M) marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder.

IV.1.3.4. TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL

Otro de los objetivos de este trabajo consistió en el desarrollo de una técnica de PCR cuantitativo en tiempo real para cuantificar la presencia de *foie gras* de pato en mezclas con *foie gras* de oca y para cuantificar la presencia de cerdo en mezclas con vaca.

IV.1.3.4.1. Cuantificación de ADN de pato en mezclas de *foie gras* pato/oca

Según se indica en la sección III.2.9.1, se prepararon mezclas binarias frescas, pasteurizadas y esterilizadas de *foie gras* de pato en *foie gras* de oca, que contenían un 25%, 10%, 1% y 0,1% de *foie gras* de pato. El ADN de cada mezcla se extrajo según se indica en la sección III.2.9.2 y se determinó espectrofotométricamente su concentración.

La cuantificación de ADN de pato en mezclas de pato/oca se realizó, como se indica en la sección III.2.9.3.1, mediante el empleo de dos sistemas de PCR complementarios consistentes en la amplificación de un fragmento de 96 pb del gen 12S ARNr específico de pato, y de un fragmento de 120 pb del mismo gen en los ADNs de pato y oca (*Figura 62*).

La segunda reacción, al amplificar el ADN total de *foie gras* de pato y oca se empleó como control endógeno para normalizar los valores obtenidos en la reacción específica de pato. Los dos sistemas de PCR utilizan un cebador directo común (*12STAQMANFW*) y una sonda común (*12SSONDA*). Sin embargo, se diferencian en los cebadores inversos (*12STAQMAND* en el sistema de PCR específico de pato y *12STAQMANREV* en el control endógeno pato+oca). Las condiciones de la reacción de PCR cuantitativo se encuentran detalladas en el apartado III.2.9.4.1. Para elaborar la recta estándar del ensayo, tanto en el sistema específico de pato como en el control endógeno de pato+oca, se utilizaron diluciones decimales seriadas del ADN plasmídico de pato obtenido en la sección III.2.9.5.1, comenzando por 100 ng de ADN.

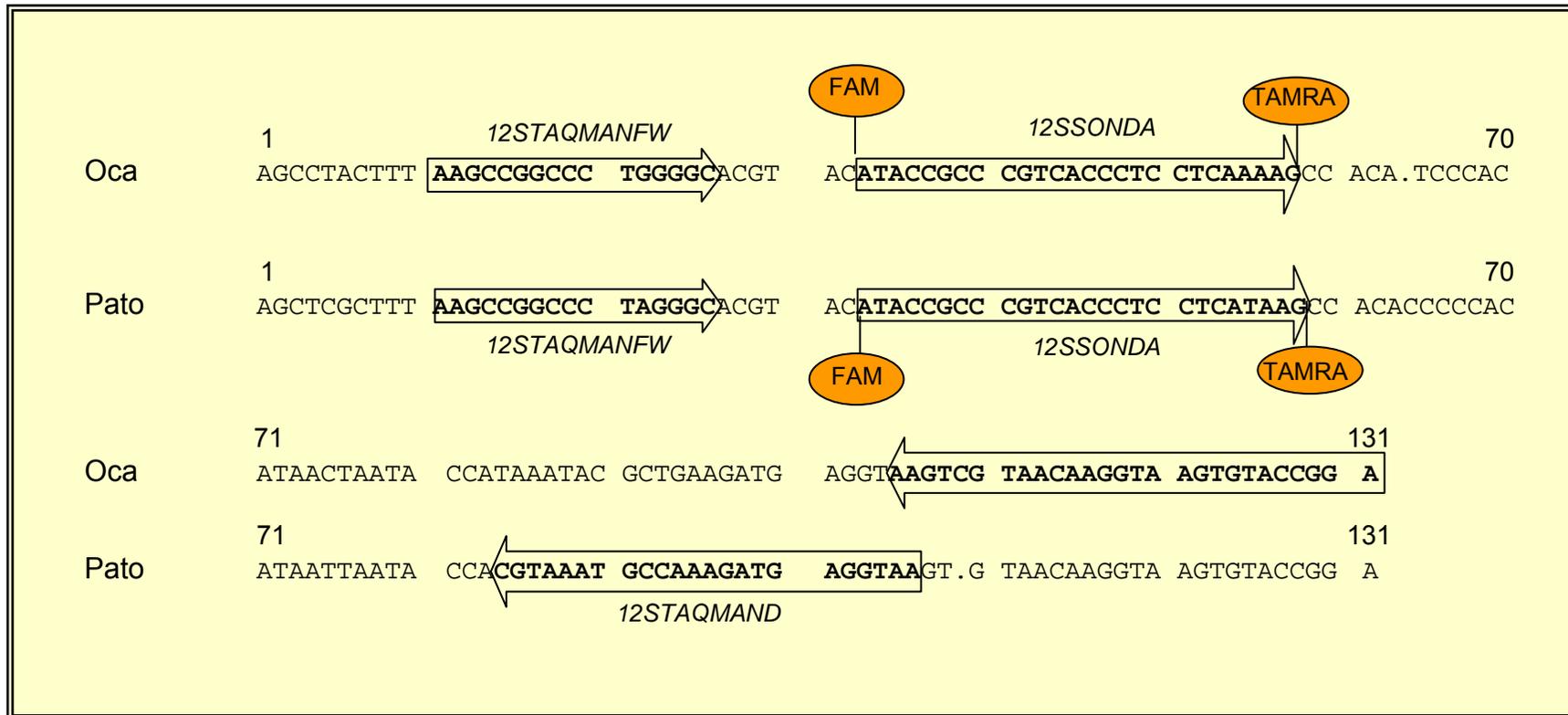


Figura 62. Alineamiento parcial de las secuencias de ADN correspondientes al gen 12S ARNr de oca (AJ583550) y pato (AJ583548), donde se indica en negrita la posición de la sonda (*12SSONDA*) y de los cebadores *12STAQMANFW* (directo), *12STAQMANREV* (inverso endógeno) y *12STAQMAND* (inverso específico) empleados en la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real. Las flechas indican el sentido 5' → 3' de los cebadores y de la sonda Taqman.

Los datos de fluorescencia obtenidos al final de cada ciclo de amplificación para cada muestra en los sistemas de PCR específico y control endógeno, se analizaron estadísticamente como se indica en la sección III.2.9.6.1 con el fin de evaluar la especificidad, sensibilidad y linealidad.

1) Especificidad

La especificidad de los sistemas de PCR específico de pato y control endógeno pato+oca se evaluó mediante el análisis de ADN procedente de diversas especies animales. El sistema específico de pato amplificó un fragmento de 96 pb en el ADN de pato (con un valor de C_t de $17,2 \pm 0,34$), mientras que no se obtuvo amplificación en los ADNs de pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja, cabra y oca (*Tabla 18*). El control endógeno pato+oca amplificó un fragmento de 120 pb en los ADNs de pato y oca (con un valor de C_t de $18,7 \pm 0,22$ en el ADN de pato mulard y de $18,9 \pm 0,19$ en el ADN de oca), no obteniéndose amplificación en los ADNs de pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra. Cuando se obtiene un valor de C_t de 40,0 significa que no ha habido señal de amplificación después de 40 ciclos (*Tabla 18*).

Tabla 18. Especificidad de los sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real específico de pato y pato+oca, empleando 10 ng de ADN			
	ESPECIES	SISTEMA DE PCR ESPECÍFICO DE PATO	SISTEMA DE PCR PATO+OCA
Pato mulard	<i>(Anas platyrhynchos x Cairina muschata)</i>	17,2±0,34	18,7±0,22
Oca	<i>(Anser anser)</i>	37,1±0,41	18,9±0,19
Pollo	<i>(Gallus gallus)</i>	40,0	40,0
Pavo	<i>(Meleagris gallopavo)</i>	40,0	40,0
Cerdo	<i>(Sus scrofa)</i>	40,0	40,0
Vaca	<i>(Bos taurus)</i>	40,0	40,0
Oveja	<i>(Ovis aries)</i>	40,0	40,0
Cabra	<i>(Capra hircus)</i>	40,0	40,0

2) Sensibilidad (límite de detección)

Para establecer el límite de detección en los dos sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real (específico de pato y control endógeno pato+oca), se analizaron diluciones decimales seriadas de ADN plasmídico de pato y de ADN de *foie gras* de pato, comenzando con 100 ng hasta 0,001 ng. Se escogió la concentración de 10 ng de ADN como la más adecuada para el análisis de las muestras con el 100% de pato, por encontrarse dentro del tramo lineal del ensayo. Este valor se empleó como referencia para asegurar la reproducibilidad de los datos obtenidos en los distintos ensayos.

El límite de detección del sistema de PCR específico de pato fue de 0,001 ng de ADN que, tomando como referencia de 100% la concentración de 10 ng de ADN, corresponde a un porcentaje de 0,01% de ADN de pato. Los resultados fueron similares cuando se empleó ADN plasmídico (*Figura 63A*) y cuando se realizaron las diluciones de ADN de *foie gras* de pato (*Figura 63B*).

Además, para comprobar la capacidad del ensayo de PCR en tiempo real para la cuantificación de ADN de pato en mezclas de *foie gras* experimentales, se analizaron 10 ng de ADN de cuatro porcentajes diferentes de *foie gras* de pato (25, 10, 1 y 0,1%) procedentes de mezclas binarias pato-oca (*Figura 64*). La detección de ADN de pato en *foie gras* de oca se consiguió incluso en las mezclas que contenían un 0,1% de pato.

3) Linealidad

Para comprobar la linealidad de la respuesta (C_t) con relación al porcentaje de pato en la mezcla, los valores de C_t se representaron frente al logaritmo de las concentraciones de ADN de pato (*Figura 65*). Los valores obtenidos para la "C" de Cochran indican que las varianzas de las respuestas obtenidas para cada concentración de pato en las mezclas frescas, pasteurizadas y esterilizadas son homogéneas, ya que el valor de la "C" de Cochran tabulada (valor obtenido en una tabla con un nivel de probabilidad del 95%, en función del número de concentraciones de ADN de pato y del número de determinaciones realizadas para cada concentración de ADN) es mayor que el valor de la "C" de Cochran obtenido en las mezclas experimentales (*Figuras 65 y 66*).

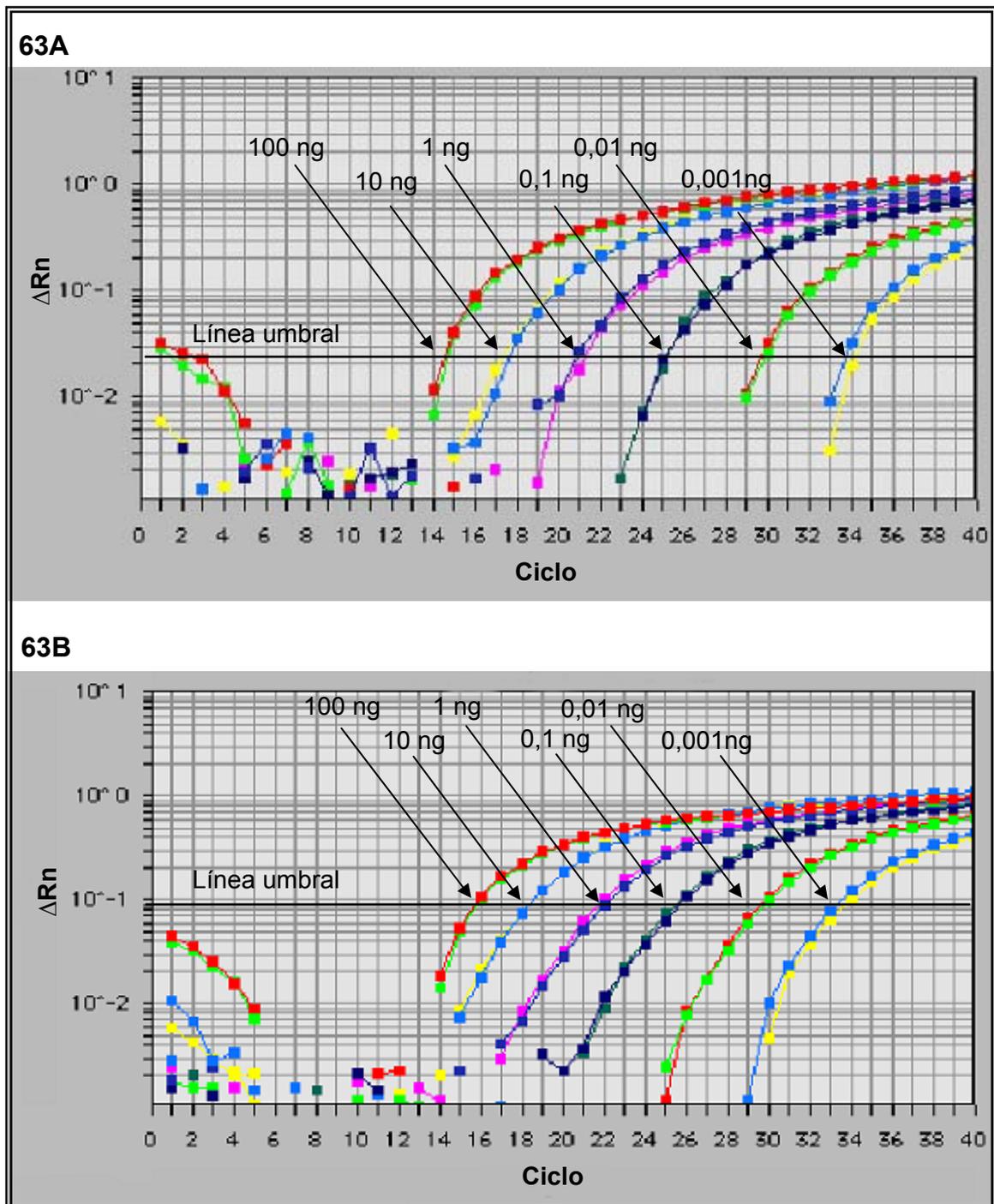


Figura 63. Representación de la fluorescencia emitida frente al ciclo de amplificación, al analizar por duplicado diluciones decimales seriadas de ADN de pato con el sistema de PCR en tiempo real específico de pato. **63A)** ADN plasmídico de pato. **63B)** ADN de *foie gras* de pato.

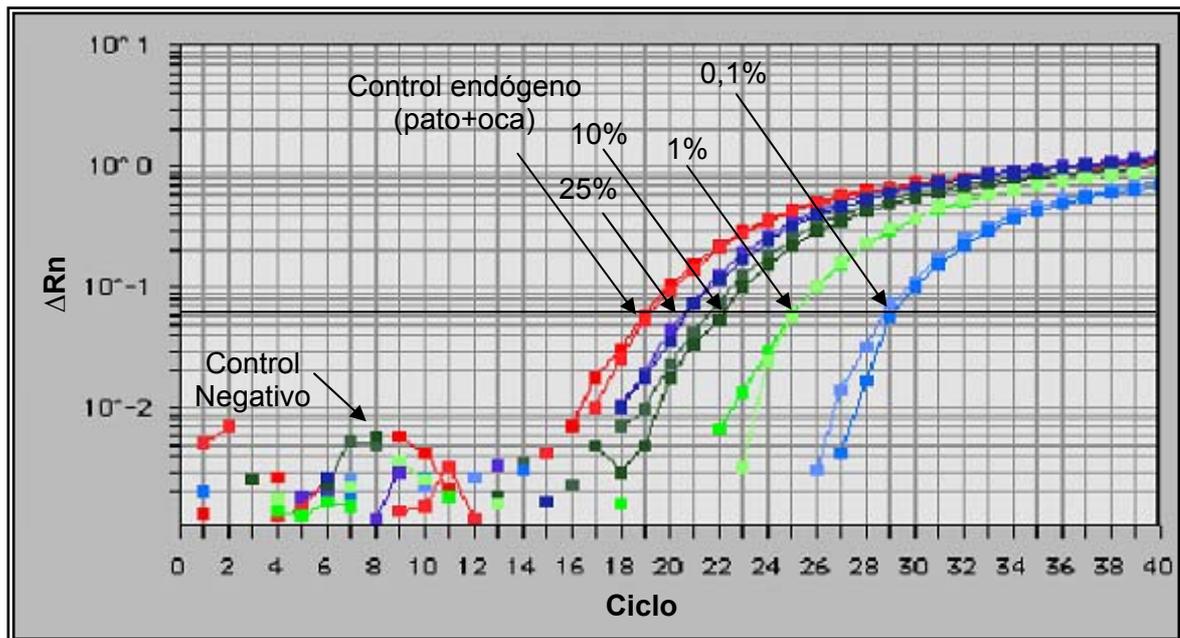


Figura 64. Representación de la fluorescencia emitida frente al ciclo de amplificación, al analizar por duplicado mezclas experimentales de *foie gras* de pato y oca (25, 10, 1 y 0,1% de pato) con los sistemas de PCR en tiempo real específico de pato y control endógeno de pato+oca.

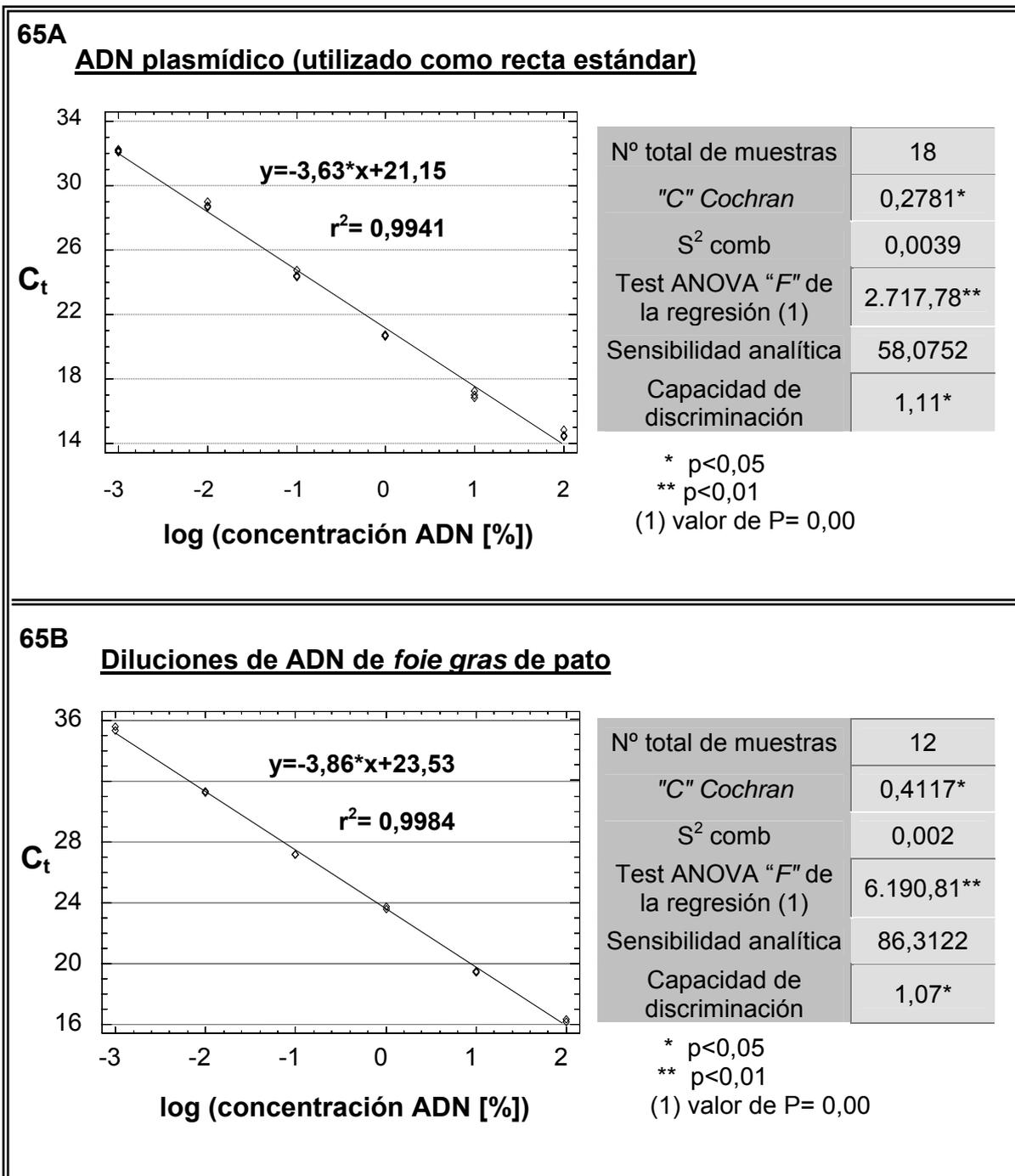
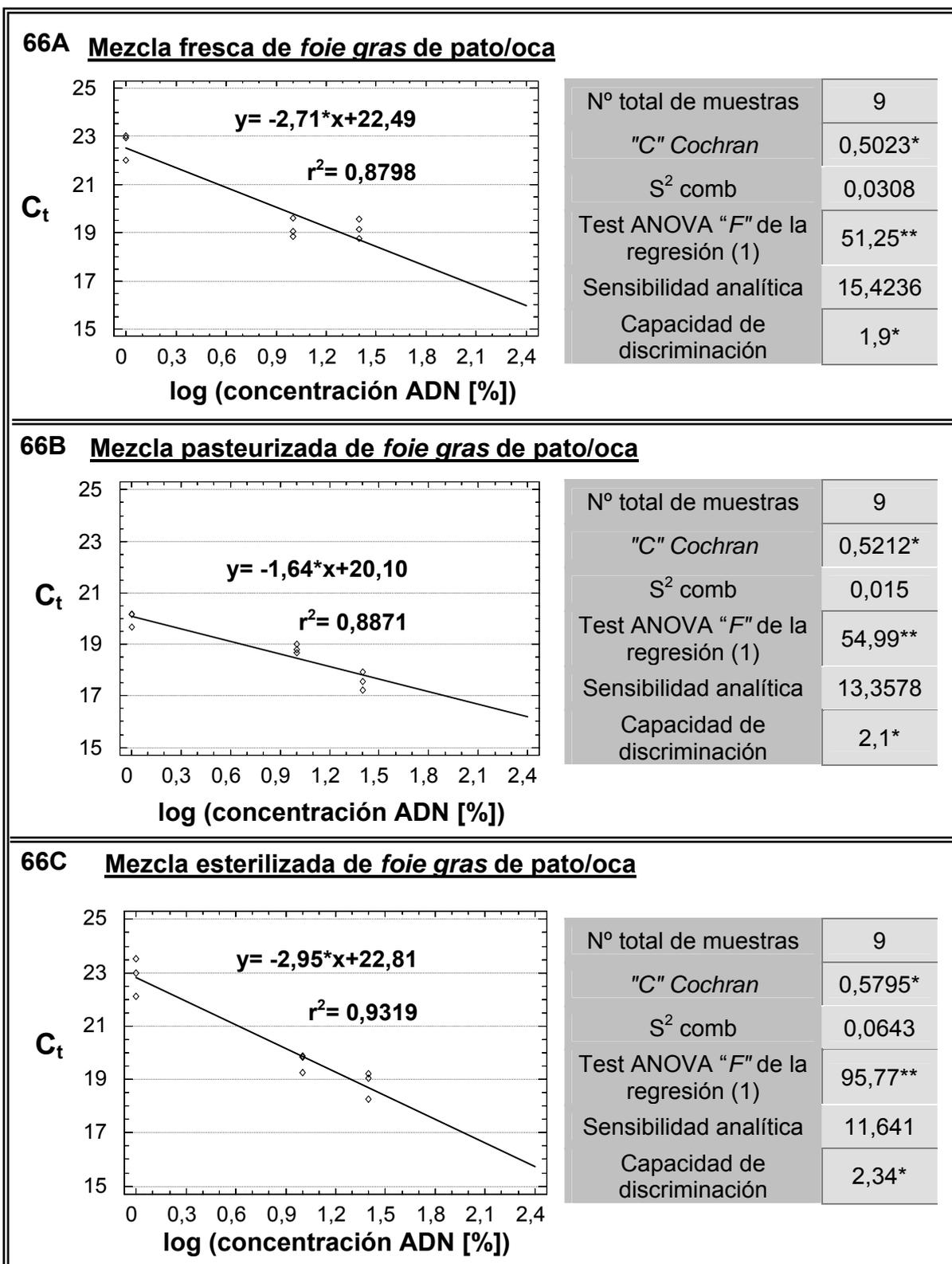


Figura 65. Test de linealidad, parámetros de regresión lineal y parámetros de sensibilidad del sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación de pato, utilizando diluciones decimales seriadas (desde 100 ng hasta 0,001 ng) de ADN plasmídico de pato (65A) o de ADN de pato (65B).



*p<0,05; ** p<0,01; (1) valor de P= 0,00

Figura 66. Test de linealidad, parámetros de regresión lineal y parámetros de sensibilidad del sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación de pato, utilizando 3 extracciones de ADN diferentes de 3 porcentajes distintos (25, 10 y 1%) de cada mezcla binaria. **66A)** Recta de calibrado de la mezcla fresca de foie gras de pato/oca. **66B)** Recta de calibrado de la mezcla pasteurizada de foie gras de pato/oca. **66C)** Recta de calibrado de la mezcla esterilizada de foie gras de pato/oca.

Como el valor de la probabilidad (P) en el análisis de varianza (ANOVA) de los datos es inferior a 0,01, se deduce que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables (C_t y logaritmo de las concentraciones de ADN) con un 99% de nivel de confianza en todas las mezclas de *foie gras* analizadas. La linealidad se conservó en 6 órdenes de magnitud utilizando diluciones del ADN plasmídico de pato (*Figura 65A*) y del ADN de pato (*Figura 65B*). La correlación existente entre las dos variables, C_t y el logaritmo de la concentración de pato, utilizando el ADN plasmídico de pato como recta estándar, mostró un coeficiente de determinación (r^2) de 0,9941, lo que indica que el 99,41% de la variación en el eje “y” es consecuencia de la variación que ocurre en el eje “x” (*Figura 65A*).

Cuando se analizaron mezclas binarias de *foie gras*, los valores más altos de coeficientes de determinación se obtuvieron en el intervalo comprendido entre 25 y 1% de pato, por lo que se eligió este intervalo como el más adecuado para la cuantificación. Los valores de C_t y las distintas concentraciones de ADN de pato (%) se relacionaron mediante la ecuación $C_t = -2,71 \log [\text{pato} (\%)] + 22,49$ ($r^2 = 0,8798$) en la recta de calibrado de las mezclas de *foie gras* fresco de pato/oca (*Figura 66A*); mientras que en las mezclas pasteurizadas (*Figura 66B*) la ecuación fue $C_t = -1,64 \log [\text{pato} (\%)] + 20,10$ ($r^2 = 0,8871$) y en las mezclas de *foie gras* esterilizado (*Figura 66C*) la ecuación fue $C_t = -2,95 \log [\text{pato} (\%)] + 22,81$ ($r^2 = 0,9319$).

La capacidad de discriminación del ensayo fue de 1,11% cuando se utilizaron diluciones de ADN plasmídico de pato, 1,07% cuando se utilizaron diluciones de ADN de pato, 1,9% en las mezclas frescas de *foie gras*, 2,1% en las mezclas pasteurizadas de *foie gras* y 2,34% en las mezclas esterilizadas de *foie gras*.

IV.1.3.4.2. Cuantificación de ADN de cerdo en mezclas binarias cerdo/vaca

Las mezclas binarias frescas y esterilizadas de tejido muscular de vaca que contenían un 5%, 1% y 0,5% de cerdo, se prepararon como se indica en la sección III.2.9.1. Posteriormente, se extrajo el ADN de cada mezcla según se indica en la sección III.2.9.2 y se determinó su concentración.

La cuantificación de ADN de cerdo en mezclas de tejido muscular cerdo/vaca mediante PCR en tiempo real, se realizó utilizando dos sistemas complementarios

de PCR que amplifican, respectivamente, un fragmento de 411 pb del gen 12S ARNr específico de cerdo y un fragmento de 425-428 pb en el gen 12S ARNr de cerdo, vaca, oveja y cabra (*Figura 67*). El segundo sistema, que amplifica un fragmento común en diversas especies animales, se emplea como control endógeno con el fin de normalizar los valores obtenidos en el sistema específico de cerdo, como se indica en la sección III.2.9.6.2. Los dos sistemas de PCR utilizan un cebador directo común (*12STAQMANFWM*) y una sonda común (*12SSONDAMAMIF*). Sin embargo, se diferencian en los cebadores inversos (*12STAQMANS* en el sistema de PCR específico de cerdo y *12STAQMANREVM* en el control endógeno de mamíferos) (*Figura 67*). Las condiciones de la reacción de PCR cuantitativo se encuentran detalladas en el apartado III.2.9.4.2. Para elaborar la recta estándar del ensayo, tanto en el sistema específico de cerdo como en el control endógeno de mamíferos, se utilizaron diluciones decimales seriadas del ADN plasmídico de cerdo obtenido en la sección III.2.9.5.2, comenzando por 100 ng de ADN.

Los parámetros que se evaluaron en las reacciones de PCR cuantitativo en tiempo real para validar el ensayo de cuantificación de ADN de cerdo en mezclas cerdo/vaca fueron:

1) Especificidad

La especificidad de los sistemas de PCR específico de cerdo y control endógeno de mamíferos se evaluó mediante el análisis de ADN procedente de diversas especies animales. El sistema específico de cerdo amplificó un fragmento de 411 pb en el ADN de cerdo (con un valor de C_t de $24,1 \pm 0,26$), mientras que no se obtuvo amplificación en los ADNs de pollo, pato, pavo, vaca, oveja, cabra y oca (*Tabla 19*). El control endógeno de mamíferos amplificó un fragmento de 428 pb en el ADN de cerdo, 426 pb en el ADN de vaca y 425 pb en los ADN de oveja y cabra. Los valores de C_t obtenidos para el control endógeno fueron de $23,5 \pm 0,18$ en el ADN de cerdo, de $23,7 \pm 0,21$ en el ADN de vaca, de $23,9 \pm 0,14$ en el ADN de oveja y de $23,6 \pm 0,23$ en el ADN de cabra, no obteniéndose amplificación en los ADNs de pollo, pavo, pato y oca. Cuando se obtiene un valor de C_t de 40,0 significa que no ha habido señal de amplificación después de 40 ciclos (*Tabla 19*).

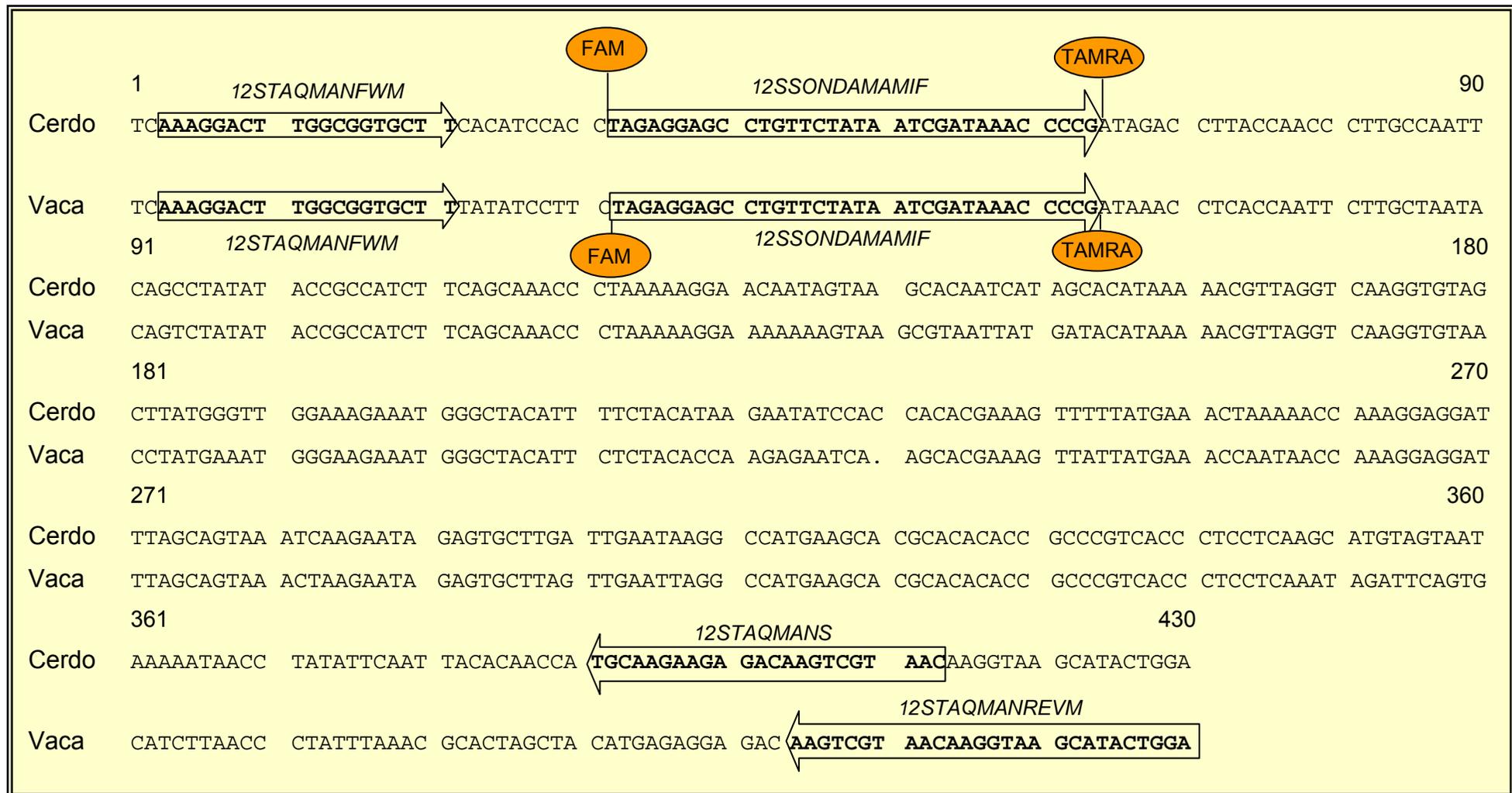


Figura 67. Alineamiento parcial de las secuencias de ADN correspondientes al gen 12S ARNr de cerdo (AJ583551) y vaca donde se indica en negrita la posición de la sonda (*12SSONDAMAMIF*) y de los cebadores *12STAQMANFWM* (directo), *12STAQMANREVM* (inverso endógeno) y *12STAQMANS* (inverso específico) empleados en la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real. Las flechas indican el sentido 5' → 3' de los cebadores y de la sonda Taqman.

Tabla 19. Especificidad de los sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real específico de cerdo y control endógeno de mamíferos, empleando 10 ng de ADN

ESPECIES		SISTEMA DE PCR ESPECÍFICO DE CERDO	SISTEMA DE PCR DE MAMÍFEROS
Cerdo	<i>(Sus scrofa)</i>	24,1±0,26	23,5±0,18
Vaca	<i>(Bos taurus)</i>	40,0	23,7±0,21
Oveja	<i>(Ovis aries)</i>	40,0	23,9±0,14
Cabra	<i>(Capra hircus)</i>	40,0	23,6±0,23
Pato mulard	<i>(Anas platyrhynchos x Cairina muschata)</i>	40,0	40,0
Oca	<i>(Anser anser)</i>	40,0	40,0
Pollo	<i>(Gallus gallus)</i>	40,0	40,0
Pavo	<i>(Meleagris gallopavo)</i>	40,0	40,0

2) Sensibilidad (límite de detección)

Para establecer el límite de detección en los dos sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real (específico de cerdo y control endógeno de mamíferos), se analizaron diluciones decimales seriadas de ADN plasmídico de cerdo, comenzando con 100 ng hasta 0,01 ng. Se escogió la concentración de 10 ng de ADN como la más adecuada para el análisis de las muestras con el 100% de cerdo, por encontrarse dentro del tramo lineal del ensayo. Este valor se empleó como referencia para asegurar la reproducibilidad de los datos obtenidos en los distintos ensayos.

El límite de detección del sistema de PCR específico de cerdo fue de 0,01ng de ADN que, tomando como referencia de 100% la concentración de 10 ng de ADN, corresponde a un porcentaje de 0,1% de ADN de cerdo (*Figura 68*).

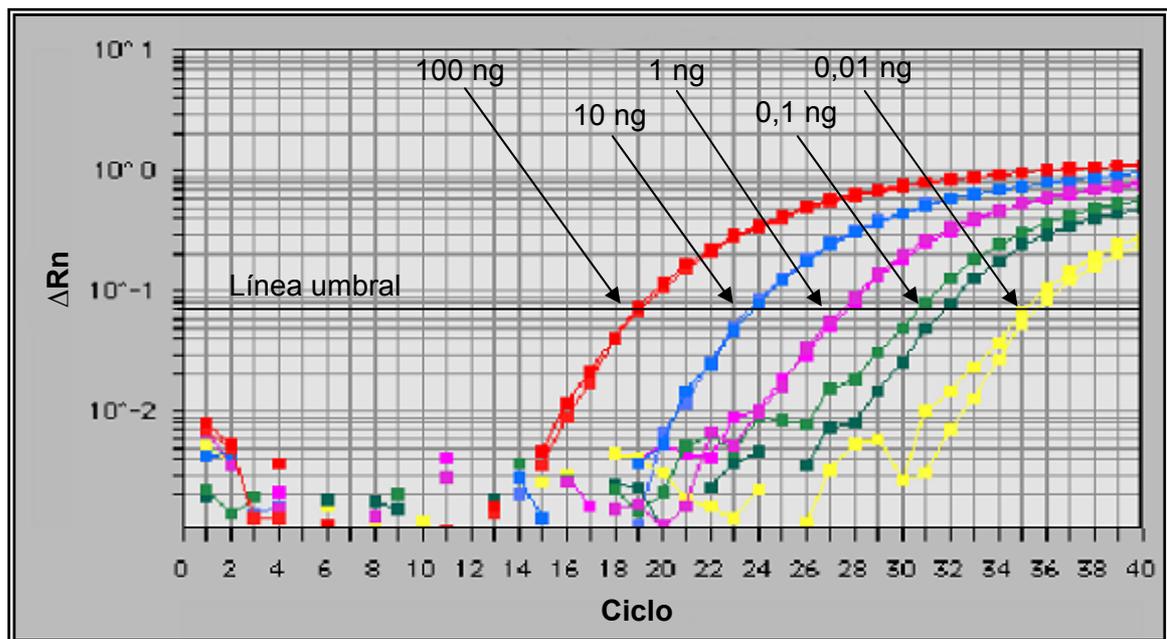


Figura 68. Representación de la fluorescencia emitida frente al ciclo de amplificación, al analizar por duplicado diluciones decimales seriadas de ADN plasmídico de cerdo con el sistema de PCR en tiempo real específico de cerdo.

Además, para comprobar la capacidad del ensayo de PCR en tiempo real para la cuantificación de ADN de cerdo en mezclas experimentales de cerdo/vaca, se analizaron 10 ng de ADN de tres porcentajes diferentes de tejido muscular de cerdo (5, 1 y 0,5%) en mezclas binarias cerdo/vaca (*Figura 69*). La detección de ADN de cerdo en tejido muscular de vaca se consiguió en las mezclas que contenían hasta un 0,5% de cerdo.

3) Linealidad

Para comprobar la linealidad de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación de ADN de cerdo, se representaron los valores de C_t frente al logaritmo de las concentraciones de ADN de cerdo en la mezcla (*Figuras 70 y 71*). Los valores obtenidos para la “C” de *Cochran* indican que las varianzas de las respuestas obtenidas para cada concentración de cerdo en las mezclas frescas y esterilizadas son homogéneas, ya que el valor de la “C” de *Cochran* tabulada es mayor que el valor de la “C” de *Cochran* obtenido en las mezclas experimentales (*Figuras 70 y 71*). Como el valor de la probabilidad (P) en el análisis de varianza (ANOVA) de los datos es inferior a 0,01, se deduce que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables (C_t y logaritmo de las concentraciones de ADN) con un 99% de nivel de confianza en todas las mezclas de tejido muscular analizadas. La linealidad se conservó en 5 órdenes de magnitud utilizando diluciones del ADN plasmídico de cerdo (*Figura 70*).

La correlación existente entre las dos variables, C_t y logaritmo de la concentración de cerdo, utilizando el ADN plasmídico de cerdo como recta estándar, mostró un coeficiente de determinación de 0,9966, lo que indica que el 99,66% de la variación en el eje “y” es consecuencia de la variación que ocurre en el eje “x” (*Figura 70*).

Cuando se analizaron mezclas binarias de tejido muscular, los valores más altos de coeficientes de determinación se obtuvieron en el intervalo comprendido entre 5 y 0,5% de cerdo, por lo que se eligió este intervalo como el más adecuado para la cuantificación.

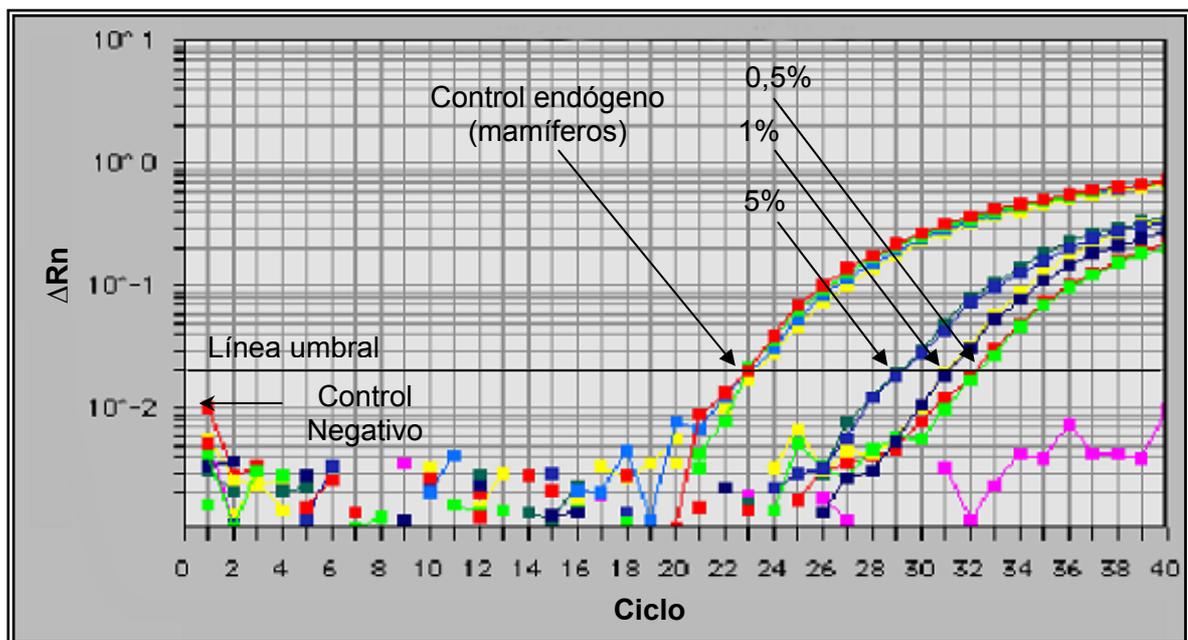


Figura 69. Representación de la fluorescencia emitida frente al ciclo de amplificación, al analizar por duplicado mezclas experimentales cerdo/vaca (5; 1 y 0,5% de cerdo) con los sistemas de PCR en tiempo real específico de cerdo y control endógeno de mamíferos.

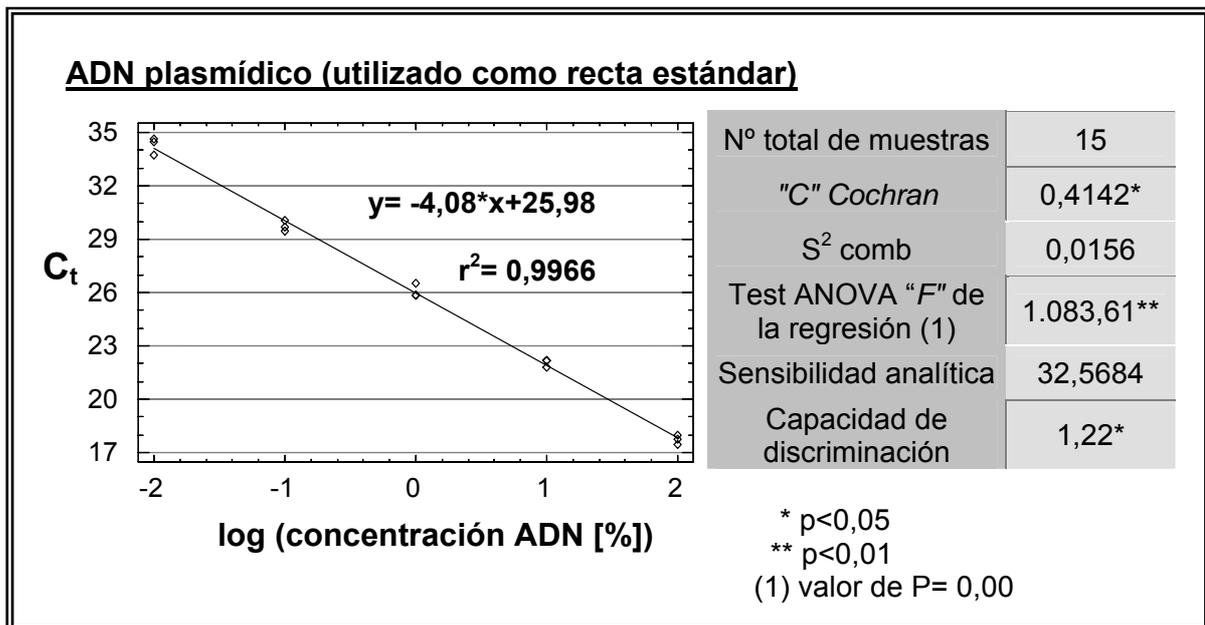


Figura 70. Test de linealidad, parámetros de regresión lineal y parámetros de sensibilidad del sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación de ADN de cerdo, utilizando diluciones decimales seriadas (desde 100 ng hasta 0,01 ng) de ADN plasmídico de cerdo.

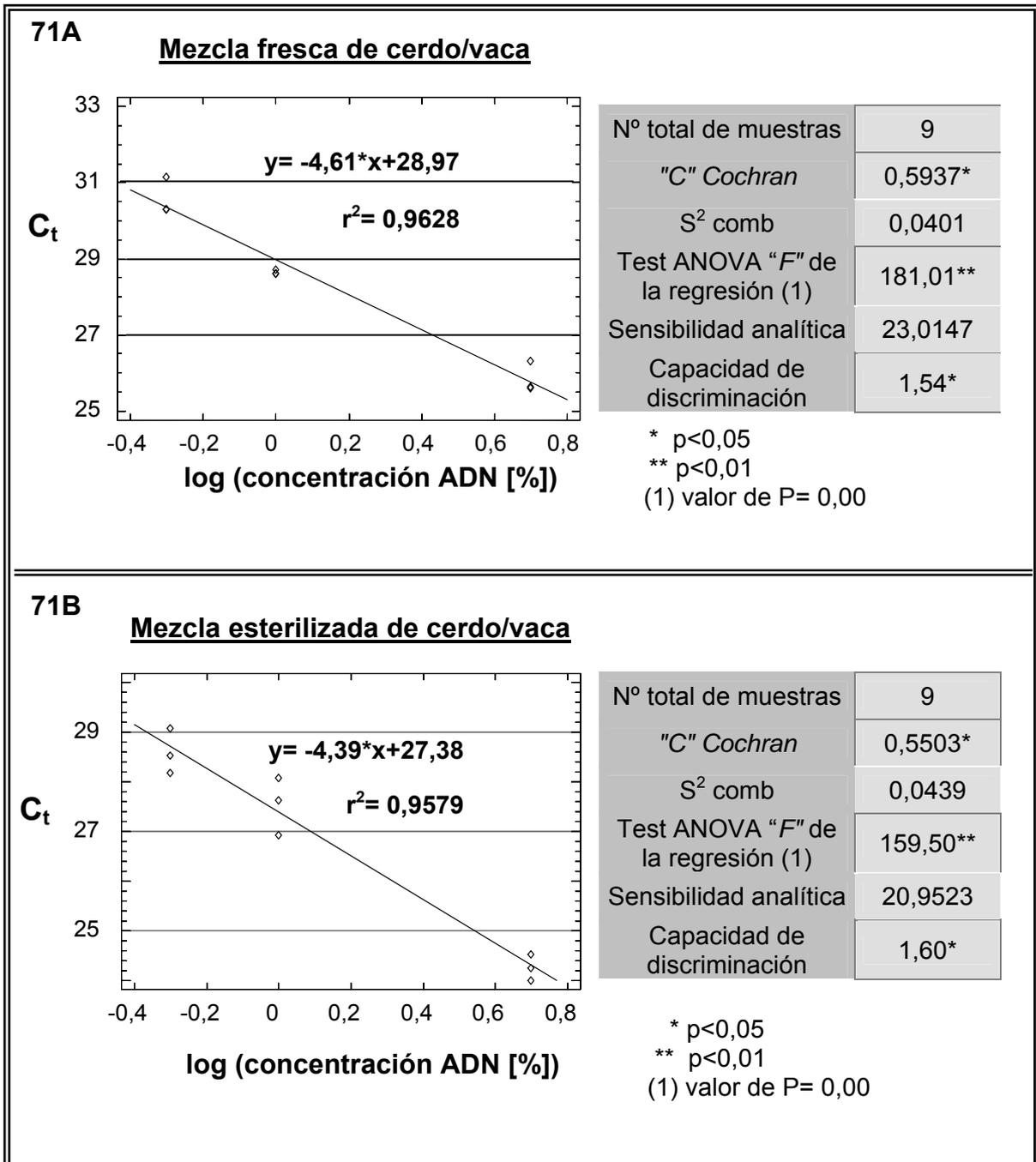


Figura 71. Test de linealidad, parámetros de regresión lineal y parámetros de sensibilidad del sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación de ADN de cerdo, utilizando 3 extracciones de ADN diferentes de 3 porcentajes distintos (5, 1 y 0,5%) de cada mezcla binaria. **71A)** Recta de calibrado de la mezcla fresca de músculo de cerdo/vaca. **71B)** Recta de calibrado de la mezcla esterilizada de músculo de cerdo/vaca.

Los valores de C_t y la concentración de ADN de cerdo (%) se relacionaron mediante la ecuación $C_t = -4,61 \log [\text{cerdo (\%)}] + 28,97$ ($r^2 = 0,9628$) en la recta de calibrado de las mezclas de tejido muscular fresco de cerdo/vaca (*Figura 71A*), mientras que en las mezclas esterilizadas (*Figura 71B*) la ecuación fue $C_t = -4,39 \log [\text{cerdo (\%)}] + 27,38$ ($r^2 = 0,9579$).

La capacidad de discriminación del ensayo fue de 1,22% cuando se utilizaron diluciones de ADN plasmídico de cerdo, 1,54% en las mezclas frescas de tejido muscular y 1,60% en las mezclas esterilizadas de tejido muscular.

IV.2. IDENTIFICACIÓN INMUNOLÓGICA DE OCA Y PATO

Los pasos desarrollados para llevar a cabo la identificación inmunológica de *foie gras* de oca y pato fueron los siguientes:

- a) Preparación de los extractos antigénicos de pato y oca necesarios para la producción de anticuerpos policlonales en conejos y para la selección de anticuerpos recombinantes específicos.
- b) Obtención de anticuerpos policlonales frente a proteínas solubles de *foie gras* de oca y pato y evaluación de su especificidad utilizando una técnica de ELISA indirecto.
- c) Selección de anticuerpos recombinantes frente a las proteínas solubles de *foie gras* fresco de oca y pato, y evaluación de su especificidad utilizando una técnica de ELISA indirecto.

A continuación se describen los resultados obtenidos con relación a los objetivos planteados en esta parte del trabajo.

IV.2.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS

Los extractos antigénicos, preparados según se describe en la sección III.3.1, estaban constituidos por una mezcla de proteínas solubles extraídas a partir de *foie gras* de oca y pato fresco y pasteurizado.

El contenido proteico de los extractos se calculó utilizando el protocolo de determinación de proteína *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad). La concentración de proteína de los extractos antigénicos liofilizados fue la siguiente:

- Oca fresca: 215 μg proteína/mg de extracto liofilizado
- Pato fresco: 190 μg proteína/mg de extracto liofilizado
- Oca pasteurizada: 132 μg proteína/mg de extracto liofilizado
- Pato pasteurizado: 119 μg proteína/mg de extracto liofilizado

IV.2.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Para la obtención de los inmunosueros policlonales se emplearon cuatro lotes de 2 conejos cada uno, que se inmunizaron con los extractos antigénicos liofilizados de proteínas solubles de oca fresca (lote 1), oca pasteurizada (lote 2), pato fresco (lote 3) y pato pasteurizado (lote 4).

Antes de comenzar el protocolo de inmunización, se extrajo una muestra de sangre a los conejos (S_0), y el suero obtenido se analizó mediante la técnica de ELISA indirecto frente a los extractos antigénicos de oca y pato. Una vez comprobada la ausencia de reactividad de los sueros de los conejos frente a los extractos antigénicos de interés, los animales se consideraron aptos para su inmunización.

A lo largo del proceso de inmunización de los conejos se comprobó, mediante la realización de sangrías parciales, si estos producían anticuerpos frente a las proteínas solubles de las especies objeto de estudio. En la sangría inicial, efectuada a los 20 días de la primera inoculación, ya se detectó una reacción inmunológica significativa de los inmunosueros frente a sus respectivos extractos antigénicos. En las sangrías parciales realizadas posteriormente, se apreció un incremento de la respuesta inmunológica de los conejos. Por ello, a los 130 días de iniciar el proceso de inmunización, se llevó a cabo la sangría final de los animales (S_f).

Los inmunosueros procedentes de la sangría final (anti-oca y anti-pato), se purificaron parcialmente mediante precipitación con sulfato amónico al 50%, según se describe en el apartado III.3.2.1.

IV.2.2.1. ELISA INDIRECTO EN PLACA

La capacidad de los anticuerpos policlonales anti-oca y anti-pato precipitados con sulfato amónico para reconocer a los extractos antigénicos de oca y pato, se determinó mediante la técnica de ELISA indirecto en placa (sección III.3.3).

En primer lugar, se establecieron las condiciones óptimas de los reactivos utilizados en el ensayo. Los resultados obtenidos en experiencias preliminares, indicaron que la dilución más apropiada de los extractos antigénicos era 1:50 en tampón PBS. La concentración óptima del conjugado comercial de anti-inmunoglobulinas de conejo marcadas con la enzima peroxidasa de rábano fue de 1:2.000 en tampón PBSTM. La dilución óptima de los anticuerpos anti-oca y anti-pato precipitados con sulfato amónico fue, en ambos casos, de 1:2.000 en tampón PBSTM.

En la *Tabla 20* se puede observar la fuerte reactividad cruzada que originaron los anticuerpos frente a los extractos antigénicos frescos y pasteurizados de la especie heteróloga en la técnica de ELISA indirecto. En consecuencia, los inmunosueros obtenidos no se consideraron adecuados para diferenciar las especies objeto de estudio.

Con el fin de eliminar las reacciones cruzadas de los inmunosueros anti-pato y anti-oca, se procedió a la purificación de los mismos mediante la técnica de inmunoadsorción descrita en la sección III.3.2.1. Sin embargo, los resultados obtenidos tras la neutralización de los anticuerpos policlonales anti-oca y anti-pato muestran también una fuerte reactividad cruzada frente a los extractos antigénicos frescos y pasteurizados de la especie heteróloga (*Tabla 21*). Cuando se incrementó la concentración de proteínas heterólogas en los inmunosueros anti-pato y anti-oca, los valores de absorbancia obtenidos eran similares a los controles.

IV.2.3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Para la obtención de anticuerpos recombinantes frente a oca y pato mulard, se procedió a la selección de una genoteca de anticuerpos humanos, denominada genoteca Griffin.

En primer lugar, se procedió a la propagación de esta genoteca y, a continuación, mediante tres rondas de selección se intentaron seleccionar fagos que

reconociesen específicamente los extractos proteicos del *foie gras* fresco de oca y pato, obtenidos como se describe en el apartado III.3.1.

Tabla 20. Resultados del ELISA indirecto en placa (A_{450} nm) obtenidos al enfrentar las proteínas solubles de oca y pato, con los anticuerpos policlonales anti-oca y anti-pato precipitados con sulfato amónico y sin neutralizar.

<i>Especie</i>	<i>n</i>	<i>anti-oca</i> ^a	<i>anti-pato</i> ^a
Oca	5	1,827 ± 0,1	2,031 ± 0,23
Pato	5	1,935 ± 0,15	1,968 ± 0,19

^a Media ± desviación estándar.

(n) = Número de muestras analizadas.

Valores de absorbancia de los controles negativos 0,11-0,195.

Tabla 21. Resultados del ELISA indirecto (A_{450} nm) obtenidos al enfrentar las proteínas solubles de oca y pato, con los anticuerpos policlonales anti-oca y anti-pato precipitados con sulfato amónico y neutralizados mediante la técnica de inmunoadsorción.

<i>Especie</i>	<i>n</i>	<i>anti-oca</i> ^a	<i>anti-pato</i> ^a
Oca	5	1,758 ± 0,06	1,365 ± 0,22
Pato	5	1,242 ± 0,15	1,741 ± 0,35

^a Media ± desviación estándar.

(n) = Número de muestras analizadas.

Con el fin de lograr anticuerpos específicos, se expusieron los fagos resultantes de cada ronda de selección a las proteínas del *foie gras* de pato y oca. Se realizaron 3 procesos de selección independientes a partir de la genoteca Griffin para obtener fagos específicos de los extractos proteicos de pato y otros 3 procesos de selección para obtener fagos específicos de los extractos proteicos de oca. Cada proceso de selección consta de 3 rondas de selección, según se describe en el apartado III.3.4.2.

IV.2.3.1. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD Y AFINIDAD DE LOS CLONES POSITIVOS MEDIANTE UNA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO

La especificidad, sensibilidad y afinidad de los clones positivos obtenidos se evaluó mediante una técnica de ELISA indirecto. Se seleccionaron los pocillos que contenían fagos “policlonales” y “monoclonales” que reconocían a cada uno de los extractos antigénicos empleados (anticuerpos anti-oca y anticuerpos anti-pato). En cada proceso de selección se encontraron una media de 7-10 pocillos positivos frente a la especie homóloga. Con el fin de seleccionar fagos específicos de especie, se consideraron pocillos productores de anticuerpos específicos frente a oca o pato, aquellos cuya absorbancia a 450 nm fuera al menos 0,8 unidades de absorbancia superior a la absorbancia obtenida en la especie heteróloga. Se consideraron pocillos negativos aquellos con valores de absorbancia similares a los de los controles negativos ($\leq 0,2$).

En todos los procesos de selección de fagos realizados, los resultados de la técnica de ELISA indirecto frente a los extractos proteicos de oca y pato mostraron clones productores de anticuerpos frente a la especie con la que se habían seleccionado. Sin embargo, cuando dichos anticuerpos se enfrentaron en una técnica de ELISA con los antígenos de la especie heteróloga, se observó que la mayoría de los pocillos positivos frente a pato lo eran también frente a oca y viceversa. En consecuencia, no se pudieron conseguir anticuerpos específicos frente a oca y pato mulard.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

V.1. IDENTIFICACIÓN DE OCA, PATO, POLLO, PAVO, CERDO, VACA, OVEJA y CABRA MEDIANTE TÉCNICAS GENÉTICAS

Las técnicas genéticas han evolucionado notablemente en los últimos años, debido a la creciente necesidad de disponer de métodos analíticos más rápidos y específicos (Lockley y Bardsley, 2000). De todas las técnicas citadas en la introducción, las inmunoenzimáticas (ELISA) y las genéticas se han convertido en las principales herramientas de identificación de especies animales.

Los métodos genéticos de identificación de especies, a pesar de ser más caros y exigir un mayor soporte técnico que los métodos de análisis de proteínas, presentan importantes ventajas frente a estos (*Tabla 7*): la pequeña cantidad de muestra requerida para el análisis, el mayor grado de variabilidad genética examinado y la posibilidad de analizar muestras sometidas a distintos tratamientos tecnológicos, incluida la esterilización (Branciarri y col., 2000b; Sun y Lin, 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido, con diferencia, la herramienta que ha permitido una mayor expansión de las técnicas genéticas. Hasta su descubrimiento, si se quería obtener un determinado fragmento de ADN en cantidad suficiente para su análisis, el único camino viable era seguir laboriosos y lentos procedimientos de clonación. La técnica de PCR, sin embargo, permite obtener millones de copias de una secuencia específica de ADN mediante una simple reacción enzimática. De este modo, esta técnica ha tenido un profundo impacto en todas las áreas de investigación biológica y biomédica, utilizándose en el diagnóstico de multitud de enfermedades genéticas y hereditarias, en el estudio del cáncer, en la detección de infecciones microbianas, en estudios de evolución molecular, en medicina forense y en la detección de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos, entre otras muchas aplicaciones (Boyapalle y col., 2001; Cloeckert, y Schwarz, 2001; Kimura y col., 2001; Aslam y col., 2003; Bellis y col., 2003; Köllermann y col., 2003).

Asimismo, las técnicas de PCR se han aplicado con éxito en la identificación de diferentes especies animales (Koh y col., 1998; Myers y col., 2003), desplazando a otras técnicas que se utilizaban anteriormente. Aunque existen varios trabajos publicados donde se emplea la reacción de PCR sin combinar con ninguna otra técnica para la identificación de especies animales (Bellagamba y col., 2003;

Bottero y col., 2003; Wang y Fang, 2003), es más frecuente la identificación de especies mediante el uso combinado de la PCR y de técnicas complementarias como la secuenciación (Bartlett y Davidson, 1992; Bataille y col., 1999; Hsieh y col., 2001; Colombo y col., 2002a, 2003), el análisis de RFLP (Wolf y col., 1999; Branciaro y col., 2000a; Montiel-Sosa y col., 2000; Lahiff y col., 2001; Verkaar y col., 2002; Seyboldt y col., 2003), el análisis de SSCP (Barroso y col., 1998; Palmer y col., 2000; Martínez y Daniélsdóttir, 2000; Laurent y Rodellar, 2001), o el análisis de RAPD (Martínez y Malmheden Yman, 1998; Rincón y col., 2000; Calvo y col., 2001b; Stepniak y col., 2002; Bednarczyk y col., 2002; Saez y col., 2004).

El objetivo de este trabajo de investigación consistió en la puesta a punto de técnicas de PCR que permitieran diferenciar específicamente oca y pato. Asimismo, se identificaron otras especies animales como pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra que podrían incluirse en el *foie gras* y sus derivados. Para llevar a cabo el objetivo propuesto fue necesario, en primer lugar, poner a punto un método que permitiera extraer ADN íntegro y libre de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa a partir de muestras de hígado, tejido muscular y tejido graso de estas especies. Asimismo, se tuvieron que seleccionar fragmentos génicos con un grado de variabilidad genética intra- e interespecífica adecuado para la diferenciación de las especies objeto de análisis. La amplificación de los fragmentos seleccionados requirió, en algunos casos, el análisis de las secuencias disponibles y el diseño de cebadores apropiados.

Una vez estudiadas las secuencias obtenidas, se pusieron a punto técnicas sencillas que permitieran poner de manifiesto diferencias especie-específicas entre los fragmentos amplificados y que pudieran por tanto utilizarse para la identificación específica de muestras de especies animales de identidad desconocida. Para llevar a cabo la identificación de oca, pato, pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra se empleó la técnica de PCR debido a su elevada reproducibilidad, especificidad y facilidad en la interpretación de los resultados, sin necesidad de utilizar técnicas complementarias como RFLP, SSCP o secuenciación. Asimismo, se puso a punto una técnica de PCR cuantitativo en tiempo real para cuantificar ADN de pato en mezclas binarias pato/oca y ADN de cerdo en mezclas binarias cerdo/vaca.

V.1.1. SELECCIÓN DE MARCADORES GÉNICOS

En la elección de marcadores genéticos es importante considerar varias premisas: (a) las regiones de ADN seleccionadas deben acumular mutaciones a una velocidad adecuada para que especies estrechamente relacionadas tengan secuencias de nucleótidos diferentes, sin que exista polimorfismo intraespecífico; (b) la longitud del segmento amplificado ha de ser suficiente para detectar diferencias interespecíficas, permitiendo a su vez la secuenciación en un gel estándar; (c) es preferible utilizar regiones del ADN que codifiquen proteínas, ya que los errores en la amplificación y/o en la secuenciación pueden detectarse fácilmente; y además, (d) teniendo en cuenta que la creación de bases de datos es un proceso largo, es aconsejable trabajar con genes cuya secuencia se haya determinado previamente en diversos organismos (Bartlett y Davidson, 1992).

Muchos de los trabajos sobre diferenciación genética de especies animales se basan en el análisis del genoma mitocondrial. Se trata de un ADN haploide y no recombinante, que no posee intrones y apenas tiene espacios intergénicos. Además, es mucho más pequeño que el ADN nuclear (16.500 ± 500 pb), cada célula posee miles de copias, y tiene una tasa de evolución 5-10 veces mayor que el ADN nuclear, por lo que existen regiones con un nivel de variabilidad genética adecuado para la diferenciación interespecífica (Meyer, 1993). Estas características representan una ventaja frente a los marcadores nucleares, especialmente cuando se analizan productos en los que los tratamientos tecnológicos aplicados dificultan la obtención de ADN de elevado tamaño molecular (Unsel y col., 1995). Por otra parte, la amplificación de marcadores nucleares puede resultar útil porque permite analizar regiones no codificantes del genoma con un alto grado de polimorfismo. Asimismo, la presencia de intrones de longitud y secuencia variable intercalados en los genes que codifican diversas proteínas, permite amplificar fragmentos genéticos cuya longitud es específica de especie (Pendás y col., 1995).

El nivel de polimorfismo de cada marcador genético condiciona su posible aplicación para el estudio de relaciones entre especies, poblaciones o individuos de una misma especie. Para identificar variaciones intraespecíficas es aconsejable trabajar con secuencias hipervariables de ADN, como los genes mitocondriales ND1, ND5 y ND6 (Anderson y col., 1982; Hiendleder y col., 1998), o la región comprendida

entre los genes ATPasa 6 – COIII (Desjardins y col., 1989; Ramírez y col., 1993). Sin embargo, en los estudios de diferenciación de especies es más útil trabajar con secuencias relativamente conservadas y fragmentos de ADN más pequeños (Meyer y Candrian, 1996; Lockley y Bardsley, 2000) .

Uno de los genes utilizados con más frecuencia para la diferenciación de especies animales es el gen mitocondrial citocromo *b* (Bartlett y Davidson, 1992; Matsunaga y col., 1999; Martínez y Daniélsdóttir, 2000; Herman, 2001; Kingombe y col., 2001; Colombo y col., 2002b; Rajapaksha y col., 2002; Hird y col., 2003). Además, se han empleado otras regiones del genoma mitocondrial como los genes de los ARN ribosómicos 12S y 16S (Borgo y col., 1996; Bellagamba y col., 2003; Bottero y col., 2003; Sun y Lin, 2003; Girish y col., 2004), las subunidades de la NADH deshidrogenasa (Walker y col., 1992; Feligini y Parma, 2003) y la región control (Takeda y col., 1995; Montiel-Sosa y col., 2000; Maudet y Taberlet, 2001).

A pesar de que la mayoría de los estudios filogenéticos y de identificación de especies han empleado ADN mitocondrial, otros emplean genes nucleares, como el que codifica la proteína α -actina (Watabe y col., 1995; Hopwood y col., 1999), el 5S ADNr (Pendás y col., 1994), el gen que codifica el factor liberador de la hormona del crecimiento (GnRH) (Meyer y col., 1995) y el gen supresor de tumores *p53* (Bucher y col., 1996; Bellis y col., 2003), entre otros.

Para llevar a cabo el objetivo planteado en este trabajo, se consideró conveniente seleccionar genes con regiones conservadas entre las especies objeto de estudio, para poder amplificar el mismo fragmento en todas ellas, o bien genes que presentasen intrones de longitud y secuencia variable para amplificar fragmentos especie-específicos. Tras realizar una exhaustiva búsqueda bibliográfica y comparar las secuencias disponibles en las bases de datos GenBank y EMBL, se eligió el gen mitocondrial 12S ARNr, y los genes nucleares 5S ADNr y α -actina, como marcadores potencialmente adecuados para la identificación de las especies animales objeto de análisis.

Una vez elegidos los marcadores génicos, se procedió a seleccionar o diseñar cebadores para su amplificación.

V.1.2. SELECCIÓN Y DISEÑO DE LOS CEBADORES

La identificación genética de la especie a la que pertenece un individuo depende, en gran medida, de la especificidad de los cebadores empleados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El diseño de cebadores específicos es relativamente sencillo, siempre que se conozca exactamente la secuencia que se desea amplificar y se respeten unas normas básicas de diseño (Sambrook y col., 1989).

Para la amplificación por PCR se pueden emplear cebadores *universales*, que permiten amplificar un fragmento génico en una gran variedad de especies (Kocher y col., 1989), o por el contrario, cebadores *especie-específicos* (Colgan y col., 2001; Lockley y Bardsley, 2002; Hird y col., 2003). También se pueden utilizar cebadores *degenerados*, en los que se introducen inosinas o una mezcla de nucleótidos en alguna posición del cebador cuya secuencia diana se desconoce. Estos últimos cebadores hacen posible la amplificación de productos de PCR en especies estrechamente relacionadas cuyas secuencias nucleotídicas son distintas y también permiten amplificar regiones de las que sólo se conoce la secuencia aminoacídica (Kwok y col., 1994).

En cualquier caso se deben elegir, dentro de lo posible, cebadores con una longitud comprendida entre 18-30 nucleótidos. Además, el porcentaje de guanina y citosina debe situarse en torno al 50%, ya que los enlaces G≡C son más estables que los de A=T. Los enlaces G≡C facilitan la hibridación con las secuencias diana a temperaturas relativamente altas, impidiendo uniones inespecíficas. Además, la temperatura de hibridación o *annealing* (T_a) de los cebadores con la secuencia diana debe ser similar. Asimismo, se debe evitar que los cebadores sean complementarios entre sí, especialmente en su extremo 3', para evitar la formación y amplificación de dímeros que reducen la eficacia de la reacción (Saiki, 1989). Finalmente, el número de bases no complementarias entre el cebador y la secuencia diana ha de reducirse al mínimo, principalmente en el extremo 3' del cebador, donde comienza la elongación de la nueva cadena de ADN generada por la polimerasa.

Cuando se diseñan cebadores, es recomendable comparar su secuencia con otras secuencias nucleotídicas de las bases de datos con el fin de identificar si existen

secuencias afines. De esta manera, aumenta la especificidad del análisis al evitar que los cebadores diseñados compartan homologías con secuencias de genes o especies distintas a las que se pretende identificar.

En este trabajo, la elección de los cebadores empleados se realizó después de un análisis de la bibliografía existente sobre la amplificación de los genes 5S ADNr, α -actina y 12S ARNr. Para el diseño de cebadores se utilizó el programa informático PRIMER EXPRESS® versión 2,0 (Applied Biosystems).

Gen 5S ADNr

El gen 5S ADNr consta, en los organismos eucariotas superiores, de una zona codificante de 120 pb (gen 5S ARNr), cuya secuencia está muy conservada en todas las especies, y de un fragmento espaciador no codificante (NTS) de longitud variable. Esta unidad básica (5S ARNr + NTS) se repite en el cromosoma un número variable de veces dependiendo de la especie (Pendás y col., 1994).

Pendás y col., (1995) diseñaron unos cebadores basados en la secuencia de la zona conservada del gen 5S ADNr de la trucha, con los que amplificaron una unidad de este gen en trucha, salmón y en híbridos salmón-trucha. El tamaño de los fragmentos amplificados fue distinto en cada una de las especies analizadas, permitiendo su diferenciación. En los híbridos de salmón y trucha se obtuvieron dos bandas, correspondientes a cada uno de sus progenitores.

En este trabajo se utilizaron los cebadores diseñados por Pendás y col., (1995), denominados 5S1 y 5S2, para amplificar diversas unidades del gen 5S ADNr de oca y pato, con el fin de diferenciar estas especies en función de la longitud de los fragmentos amplificados. Además, se diseñaron los cebadores 5SG y 5SD cuya secuencia está basada en los fragmentos espaciadores (NTS) de oca y pato y es específica de cada una de estas especies. Finalmente, se diseñó el cebador 5S3, localizado en la región conservada del gen 5S ADNr de ambas especies.

Gen α -ACTINA

La α -actina es una de las proteínas musculares esqueléticas más importantes junto con la miosina, y está implicada en la regulación de la contracción y relajación del músculo a través del calcio, mediado a su vez por la interacción de proteínas

reguladoras como la troponina y la tropomiosina (Ebashi y Endo, 1968). En las bases de datos están disponibles las secuencias nucleotídicas de este gen para varias especies, como el hombre (Taylor y col., 1988), ratón (Hu y col., 1986), rata (Zakut y col., 1982) y el pollo (Fornwald y col., 1982).

Para la amplificación de un fragmento del gen α -actina en la oca, el pato, el pollo y el cerdo se emplearon los cebadores Act2 y Act4, diseñados por Watabe y col., (1995) para la amplificación y secuenciación del ADNc que codifica dicha proteína en la carpa y el carpín. Para su diseño se basaron en regiones conservadas de las secuencias de la α -actina humana y en las de pollo, rata y ratón. La secuencia del ADNc de este gen amplificada con los cebadores Act2 y Act4 en la carpa y el carpín, tiene una longitud de 521 pb y codifica una cadena peptídica de 173 aminoácidos cerca del extremo C-terminal.

Para secuenciar el fragmento amplificado con los cebadores Act2 y Act4 en el ADN de oca, pato, pollo y cerdo, fue necesario diseñar un tercer cebador, denominado Act3.

Las secuencias del gen α -actina obtenidas en este trabajo con los cebadores Act2 y Act4 permitieron diseñar los oligonucleótidos específicos de oca (ActG), pato (ActD), pollo (ActC) y cerdo (ActP), con los que se completó la identificación genética de las cuatro especies.

Gen 12S ARNr

El 12S ARNr es uno de los dos genes que codifican ARN ribosómico dentro del genoma mitocondrial de los animales (*Figura 9*). Tiene una longitud de 819-975 pb (Springer y Douzery, 1996) y se conoce su secuencia completa en diversas especies animales como *Bos taurus* (Anderson y col., 1982), *Ovis aries* (Hiendleder y col., 1998), *Capra hircus* (Feligini y Parma, 2003), *Gallus gallus* (Desjardins y Morais, 1990), *Sus scrofa* (Lin y col., 1999), *Meleagris gallopavo* (Mindell y col., 1997) y *Anas platyrhynchos* (Mindell y col., 1996).

Kocher y col., (1989) diseñaron una pareja de cebadores universales con la que amplificaron un fragmento de 386 pb del gen 12S ARNr de más de 100 especies animales. Borgo y col., (1996), amplificaron con estos cebadores un fragmento del gen 12S ARNr de diversas especies de caracol. Asimismo, Girish y col., (2004)

utilizaron los cebadores diseñados por Kocher y col., (1989) para identificar la especie de procedencia en muestras de carne amplificando un fragmento de 456 pb en el gen mitocondrial 12S ARNr.

Otros investigadores (Bellagamba y col., 2003; Bottero y col., 2003; Sun y Lin, 2003) se han basado en las secuencias del gen 12S ARNr disponibles en la base de datos GenBank para diseñar cebadores con los que han identificado diversas especies de mamíferos (vaca, cerdo, oveja y cabra).

Las parejas de cebadores 12SFW/12SREV y 12SFWM/12SSEQ utilizadas en este trabajo, se diseñaron a partir de las secuencias disponibles en la base de datos GenBank para pato, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra, con el fin de amplificar fragmentos comunes del gen 12S ARNr en las distintas especies objeto de estudio.

Las secuencias del gen 12S ARNr de oca, pato, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra obtenidas en este trabajo tras la amplificación con las parejas de cebadores 12SFW/12SREV y 12SFWM/12SSEQ, permitieron diseñar los oligonucleótidos específicos de especie 12SG, 12SD, 12SC, 12ST, 12SS, 12SBT, 12SOA y 12SCH, con los que se completó la identificación genética de las ocho especies.

V.1.3. EXTRACCIÓN DEL ADN

Para llevar a cabo la identificación genética de especies animales, es necesario extraer de las muestras una cantidad suficiente de ADN de buena calidad. La calidad del ADN extraído está determinada, tanto por su tamaño molecular como por su grado de pureza. Estos parámetros son los que van a condicionar los resultados de la reacción de amplificación.

La calidad del ADN que se extrae de una muestra está estrechamente relacionada con el tamaño molecular de los fragmentos de ADN obtenidos, expresado en pares de bases de nucleótidos. El ADN se puede degradar por diversas causas, aunque la más frecuente es el empleo de tratamientos térmicos en los alimentos que lo fragmentan, limitando la eficacia de la reacción de PCR. Sin embargo, incluso a partir de muestras con ADN degradado es posible amplificar y analizar fragmentos de ADN específicos de especie (Mackie y col., 1999).

Aunque la técnica de PCR es extremadamente específica, su sensibilidad puede verse reducida, o incluso inhibida, cuando el ADN objeto de análisis se extrae

directamente de una matriz compleja como es un alimento. En estos casos, la inhibición de la PCR puede ser el resultado de la ya comentada degradación del ADN diana, de una lisis insuficiente de los tejidos, de la desnaturalización de la ADN polimerasa, de la quelación de los iones magnesio requeridos en la reacción, y de las propias sustancias inhibitoras de la PCR que frecuentemente se encuentran en los alimentos (compuestos fenólicos, ácidos grasos, calcio, glucógeno, etc.). Además, pueden interferir en la amplificación contaminantes como el polvo de los guantes utilizados por el analista, el polen presente en el aire, el plástico del material de laboratorio empleado, etc. Por lo tanto, en los alimentos coexisten una gran variedad de factores determinantes de la calidad del ADN extraído, y de su susceptibilidad para ser amplificado por PCR.

En este trabajo, la integridad del ADN extraído a partir de las muestras de *foie gras*, tejido muscular y tejido graso de diversas especies animales se determinó electroforéticamente comparando la migración del ADN obtenido con las bandas de un marcador de peso molecular en un gel de agarosa. El grado de pureza se evaluó mediante espectrofotometría de absorción, empleando las relaciones de absorbancia $A_{260\text{nm}/280\text{nm}}$ y $A_{230\text{nm}/260\text{nm}}$. Además de tener en cuenta la posible degradación del ADN y la presencia de inhibidores de la reacción de PCR, hay que considerar que la amplificación de fragmentos génicos depende también de que los reactivos de la mezcla se encuentren en proporciones adecuadas, así como del empleo de cebadores que hibriden adecuadamente.

De lo expuesto anteriormente se deduce que la aplicación de las técnicas genéticas al análisis de los alimentos, se extenderá con mayor o menor rapidez en función de la disponibilidad y puesta a punto de métodos sencillos y eficaces que permitan obtener ADNs de buena calidad y libres de sustancias inhibitoras. Lo ideal sería disponer de un método que fuera rápido, sencillo de realizar y que proporcionara buenos resultados a partir de cualquier tipo de alimento.

Los métodos clásicos de extracción de ADN comprenden una primera fase de digestión de la muestra con detergentes y proteasas, seguida de la separación de proteínas y polisacáridos con disolventes orgánicos (fenol y cloroformo) para, finalmente, precipitar con etanol o isopropanol el ADN presente en la fase acuosa (Sambrook y col., 1989). Como alternativa a estos métodos, generalmente

laboriosos, las empresas de biotecnología han diseñado *kits* comerciales basados en el empleo de resinas que sirven para aislar el ADN de muestras complejas, o en la utilización de elevadas concentraciones de agentes caotrópicos como el isotiocianato de guanidina (GuSCN), que unen los ácidos nucleicos a partículas de diatomeas o sílice (Boom y col., 1990). Como ya se ha señalado, cualquiera que sea el método empleado, se debe garantizar que el ADN extraído esté suficientemente puro y libre de sustancias inhibitoras de las reacciones enzimáticas que intervienen en los posteriores análisis genéticos de las muestras.

En este trabajo se emplearon tres métodos para la extracción del ADN de las muestras de oca, pato, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra: un método convencional, desarrollado por DeSalle y col., (1993) y los *kits* comerciales *Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food* y *Wizard[®] DNA Clean-up* (secciones III.2.3.3 y III.2.3.4).

El método de DeSalle y col., (1993) ideado para la extracción del ADN genómico animal, comprende 4 fases: digestión de la muestra con el tampón de lisis TSM (Tris 0,2 M; EDTA 0,1 M; SDS 1%) y proteinasa K, purificación del ADN con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1) y una doble precipitación del ADN con etanol. Ambas precipitaciones parecen tener importantes repercusiones en la calidad final de los ácidos nucleicos obtenidos. De entre los múltiples métodos tradicionales de extracción de ADN propuestos en la bibliografía, se seleccionó el de DeSalle y col., (1993), como se describe en el apartado III.2.3.1., ya que había sido utilizado previamente con éxito en muestras de pescado (Céspedes y col., 1998). Fue necesario realizar pequeñas modificaciones al método descrito por DeSalle y col., (1993) para obtener un elevado rendimiento y pureza en el ADN extraído de muestras de *foie gras* de oca y pato (*Figura 33*). Estas modificaciones consistieron en centrifugar la muestra tras su digestión para eliminar la mayor parte de la grasa contenida en los hepatocitos, y en prolongar el periodo de precipitación del ADN con etanol (*Figura 22*).

Alternativamente, se utilizaron dos *kits* comerciales (*Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food* y *Wizard[®] DNA Clean-up*) para la extracción del ADN de las especies animales objeto de estudio. El *Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food* se basa en la utilización de partículas paramagnéticas que se

unen a los ácidos nucleicos en solución. En primer lugar, se produce una lisis de la muestra en presencia de enzimas ARNasas y posteriormente, una segunda lisis y una precipitación de los ácidos nucleicos. A continuación, el lisado se mezcla en un tubo de microcentrífuga con las partículas *MagneSil™ PMPs*, que capturan el ADN. Las partículas magnéticas unidas al ADN se separan del resto de los componentes de la muestra por medio de un imán y se lavan tres veces con etanol. Finalmente, se eluye el ADN con un tampón de baja fuerza iónica. El grado de pureza e integridad del ADN extraído con este *kit* fueron deficientes, aunque permitieron la amplificación mediante PCR de los fragmentos génicos seleccionados.

El método *Wizard® DNA Clean-up* se basa en la utilización de una resina que se une a los ácidos nucleicos. Para extraer el ADN, el sobrenadante obtenido tras la lisis celular se mezcla con la resina del *kit* y la mezcla resina/sobrenadante se pipetea en el interior de una jeringa, acoplada a una minicolumna. A continuación, se aplica vacío para favorecer el paso de la muestra y se lava la columna mediante la adición de isopropanol al 80% y aplicación de vacío. La minicolumna se transfiere a un tubo limpio, se centrifuga para eliminar los restos de alcohol, y finalmente, se eluye el ADN con un tampón de baja fuerza iónica. El grado de pureza del ADN extraído con este *kit* fue adecuado, y permitió la amplificación mediante PCR de los fragmentos génicos seleccionados.

Las principales ventajas del *kit* comercial *Wizard® DNA Clean-up* son su rapidez, comodidad para analizar varias muestras simultáneamente y la obtención de ADN de buena calidad sin necesidad de utilizar disolventes orgánicos. Sin embargo, el mayor inconveniente es su coste, muy superior al del método de DeSalle y col., (1993) y de otros métodos clásicos de extracción de ácidos nucleicos.

V.1.4. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR pueden clonarse en un vector antes de su secuenciación, o bien secuenciarse directamente. No obstante, antes de llevar a cabo la secuenciación de los productos de PCR, conviene eliminar los restos de cebadores, nucleótidos y sales de la reacción de amplificación. En este trabajo, los productos de PCR generados tras la amplificación con los cebadores seleccionados se purificaron con el *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) para

eliminar los cebadores, así como cualquier sustancia que pudiera interferir en la reacción de secuenciación.

Para la secuenciación de los fragmentos amplificados con la pareja de cebadores 5S1/5S2 en las muestras de oca y pato, y los cebadores Act2/Act4 en oca, pato, pollo y cerdo, estos se clonaron en un vector utilizando el *kit* comercial *pGEM[®]-T Easy Vector System II* (Promega) y, posteriormente, se secuenciaron con los cebadores del vector M13F y M13R. Sin embargo, para la secuenciación de los fragmentos generados con las parejas 12SFw/12SREV en las muestras de oca, pato, pollo, pavo y cerdo, y 12SFwM/12SSEQ en las muestras de vaca, oveja, cabra y cerdo, estos se purificaron y secuenciaron directamente en ambas direcciones, cada uno con sus correspondientes parejas de cebadores.

La secuenciación de los productos de PCR tiene por objetivo identificar diferencias en la cadena de oligonucleótidos que permitan distinguir las especies objeto de estudio. La identificación de tales diferencias suele requerir la utilización de programas informáticos complejos. En algunos casos, se emplean programas que estudian las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas en varias especies, tales como PAUP (Swofford, 1993), PHYLIP (Felsenstein, 1993) y TREECON (Van de Peer y De Wachter, 1993). En otros casos, la elaboración de matrices de distancias genéticas entre secuencias (Tajima y Nei, 1984) es más apropiada para diferenciar especies que los estudios filogenéticos.

La técnica de PCR-Secuenciación es muy útil para la diferenciación de especies, pero resulta cara, laboriosa y requiere personal especializado. Por lo tanto, no resulta adecuada como método de análisis rutinario de un gran número de muestras. No obstante, en nuestro trabajo fue necesario recurrir a la secuenciación de los fragmentos generados con los cebadores 5S1/5S2, Act2/Act4, 12SFw/12SREV y 12SFwM/12SSEQ para comparar las secuencias de los distintos amplicones generados en las especies animales de interés, con el fin de diseñar cebadores especie-específicos que permitieran, mediante una simple PCR, una identificación rápida e inequívoca de las mismas.

V.1.5. TÉCNICA DE PCR UTILIZANDO EL GEN 5S ADNr

El gen 5S ADNr tiene un especial interés en la identificación de especies, debido su estructura característica. Este gen consta, en los organismos eucariotas superiores, de una zona codificante de 120 pb (gen 5S ARNr) cuya secuencia está muy conservada en todas las especies, y de un fragmento espaciador no codificante (NTS) (*Figura 21*). El tamaño del NTS no supera los límites de amplificación por PCR (2-3 Kb) y normalmente es específico de especie (Little y Braaten, 1989; Baum y Bailey, 1997; Belkhiri y col., 1997). Asimismo, esta unidad básica (5S ARNr + NTS) se repite en el cromosoma un número variable de veces para cada especie (Pendás y col., 1994). Estas secuencias repetitivas de ADN muestran una elevada homogeneidad intraespecífica y una elevada variabilidad interespecífica, por lo que se han empleado con éxito como marcadores génicos para la identificación de especies (Murakami y Fujitani, 1998; Pellicia y col., 1998). Además, se han utilizado para determinar la relación filogenética entre especies estrechamente relacionadas en una gran variedad de organismos, incluyendo varios vertebrados (Quinn y col., 1992; Wijers y col., 1993).

Pendás y col., (1994, 1995) diseñaron una pareja de cebadores, basados en la región conservada del gen 5S ADNr de trucha (Komiya y Takemura, 1979), con el fin de amplificar una o más unidades básicas de dicho gen en salmón, trucha y sus híbridos. La localización de estos cebadores, denominados 5S1 y 5S2, corresponde a los nucleótidos 24-45 y 1-21, respectivamente, de la región codificante del 5S ARNr (*Figura 21*). Al ser divergentes, los cebadores 5S1 y 5S2 permiten amplificar al menos una unidad básica del gen 5S ADNr (5S ARNr + NTS), siempre que se encuentren dos unidades repetidas en tándem. Los fragmentos amplificados por Pendás y col., (1995) mostraron diferente tamaño en el salmón y en la trucha, permitiendo la identificación de ambas especies. En los híbridos *salmón x trucha* se obtuvo un fragmento correspondiente a cada uno de los progenitores. Pendás y col., (1995) no observaron variabilidad intraespecífica en el tamaño del fragmento amplificado cuando analizaron 24 individuos de 10 poblaciones distintas de salmón y 20 individuos de 10 poblaciones de trucha. Tampoco detectaron polimorfismo en las secuencias al digerir los productos de PCR con 11 enzimas de restricción diferentes.

En este trabajo se han utilizado los cebadores 5S1 y 5S2 para amplificar el gen 5S ADNr a partir de muestras de oca y pato mulard. El análisis electroforético de los productos de PCR permitió verificar la amplificación de dos fragmentos de aproximadamente 250 y 500 pb en el pato mulard, y de cuatro fragmentos de aproximadamente 250, 500, 750 y 1.000 pb en la oca (*Figura 34*). Se analizaron 15 individuos de cada especie, verificando la ausencia de variaciones intraespecíficas.

Tras la secuenciación de los fragmentos de aproximadamente 250 pb en la oca y el pato mulard se comprobó que correspondían al gen 5S ADNr. El fragmento secuenciado resultó ser de 237 pb en las muestras de oca y de 246 pb en las muestras de pato mulard, que correspondían a una unidad del gen 5S ADNr, que contenía una zona codificante (gen 5S ARNr) y el fragmento espaciador no codificante (NTS) específico de especie (de 119 pb de longitud en la oca y de 128 pb en el pato mulard).

La presencia de varias bandas de amplificación en una misma especie puede tener dos orígenes: la existencia en el individuo de unidades repetitivas del gen 5S ADNr con espaciadores (NTS) de diferente longitud, o la amplificación de varias unidades consecutivas de este gen pero del mismo tamaño. En este sentido, Pendás y col. (1994) comprobaron por técnicas de clonación, secuenciación e hibridación con sondas fluorescentes, que las dos bandas de ADN amplificadas en el salmón contenían fragmentos espaciadores de distinto tamaño debido a que cada una de las unidades repetitivas del gen 5S ADNr se encontraba en una localización diferente del genoma. Sin embargo, Céspedes y col., (1999b) amplificaron un fragmento de ADN de 830 pb en el lenguado que correspondía a dos unidades idénticas (415 pb + 415 pb) y consecutivas del gen 5S ADNr.

En este trabajo, tan sólo se secuenciaron las bandas más pequeñas (aproximadamente 250 pb) amplificadas en las especies objeto de estudio, pero las longitudes de los fragmentos obtenidos en el gen 5S ADNr (dos fragmentos de aproximadamente 250 y 500 pb en el pato mulard, y cuatro fragmentos de aproximadamente 250, 500, 750 y 1.000 pb en la oca) inducen a pensar que el tamaño de las distintas bandas correspondía a la amplificación de una o varias unidades consecutivas del gen 5S ADNr.

Debido a que los productos de PCR del gen 5S ADNr en oca y pato mulard tienen un tamaño similar (237 y 246 pb) no se pudieron diferenciar claramente mediante una electroforesis en gel de agarosa (*Figura 34*). Además, una muestra desconocida perteneciente a una especie diferente, podría identificarse erróneamente como pato mulard u oca si la longitud de su NTS fuera similar. Con el fin de conseguir la identificación inequívoca de las especies de interés, se diseñaron 2 cebadores específicos de especie, uno en el NTS del pato (5SD) y otro en el de la oca (5SG), tras el análisis comparativo de las secuencias del gen 5S ADNr de las especies objeto de estudio. Asimismo, se diseñó el cebador 5S3, localizado en la región codificante del 5S ARNr y común a las secuencias de oca y pato. La *Figura 36* muestra como las regiones codificantes 5S ARNr de oca y pato mulard son idénticas en longitud y secuencia, mientras que la región espaciadora NTS presenta un 85% de similaridad entre ambas.

Con el fin de disponer de una técnica lo más fácil y rápida posible para la identificación de pato y oca, los cebadores 5SG y 5SD, junto con el oligonucleótido 5S3, se utilizaron en un formato de PCR múltiple, generando fragmentos de ADN especie-específicos: un fragmento de 106 pb del gen 5S ADNr de pato mulard y un fragmento de 171 pb del mismo gen de oca (*Figura 37*) (Rodríguez y col., 2001). Por tanto, mediante el uso de una simple reacción de PCR se consiguió la identificación rápida e inequívoca de todas las muestras procedentes de las dos especies analizadas, comprobando de nuevo la ausencia de variación intraespecífica.

La identificación oca y pato mediante el método de PCR múltiple se basa en la diferencias de tamaño de los amplicones obtenidos en cada especie, y también en la presencia de secuencias diana específicas para cada especie estudiada. Por ello, la reacción de PCR múltiple con los cebadores 5S3, 5SG y 5SD es una técnica más adecuada para la identificación de *foie gras* de oca y pato mulard que la reacción de PCR utilizando los cebadores 5S1 y 5S2, que no permitía la identificación clara de las dos especies analizadas, debido a las pequeñas diferencias de longitud existentes en el NTS.

Aunque la optimización de los parámetros en una reacción de PCR múltiple es más compleja que en una reacción de PCR común, esta técnica se está convirtiendo en

un método de ensayo rápido y conveniente tanto en la clínica como en el laboratorio de investigación, y se ha empleado con éxito en diversas áreas como el análisis de polimorfismos, en ensayos cuantitativos y en RT-PCR (Henegariu y col., 1997). La puesta a punto de la PCR múltiple tiene la ventaja de que permite reducir el coste de cada análisis. Esto es muy importante cuando se estudia la viabilidad de la implantación de la técnica para llevar a cabo análisis rutinarios en laboratorios de control de calidad.

Bataille y col., (1999) utilizaron la técnica de PCR múltiple para la identificación de diversas especies animales (pollo, vaca, caballo y hombre) empleando cuatro cebadores, correspondientes a dos genes mitocondriales diferentes (citocromo b y región D-loop).

Matsunaga y col., (1999) identificaron seis especies animales (vaca, cerdo, pollo, oveja, cabra y caballo) en productos cárnicos, utilizando la técnica de PCR múltiple. Estos investigadores añadieron a la mezcla de PCR seis cebadores, cada uno de ellos específicos de una especie, más un cebador común a todas ellas. De este modo, amplificaron fragmentos del gen citocromo b de diferente tamaño en cada una de las especies.

Colombo y col., (2002b) determinaron el porcentaje de ADN de cerdo y oca en mezclas binarias de estas especies, mediante PCR múltiple en un fragmento del gen citocromo b, seguido de un análisis del gel de electroforesis asistido por ordenador.

Bottero y col., (2003) desarrollaron una técnica de PCR múltiple, utilizando los genes mitocondriales 12S y 16S ARNr, para identificar la presencia de vaca, oveja y cabra en muestras de leche y queso.

Dalmasso y col., (2004) aplicaron la técnica de PCR múltiple para identificar diferentes especies animales (rumiantes, peces, aves y cerdo) en piensos.

Otros investigadores han utilizado la técnica de PCR múltiple empleando cebadores diseñados a partir del gen 5S ADNr. Así, Céspedes y col., (1999b) utilizaron la técnica de PCR múltiple para diferenciar lenguado y fletán negro, mediante el empleo de oligonucleótidos especie-específicos diseñados a partir del gen 5S ADNr de ambas especies. Estos cebadores específicos, junto con un

cebador común, se incorporaron en la misma reacción y permitieron la diferenciación de las muestras. En otro trabajo, Asensio y col. (2001) identificaron muestras de perca, mero, y cherna utilizando también un cebador directo, común a las tres especies, y tres cebadores inversos especie-específicos, basados en el gen 5S ADNr.

La identificación de muestras de *foie gras* de oca y pato mulard mediante la técnica de PCR múltiple presenta la ventaja, con respecto a otras técnicas como PCR-RFLP y PCR-SSCP, de que únicamente requiere un análisis electroforético de los productos de PCR, evitando el uso de enzimas de restricción (RFLP) o la desnaturalización del ADN (SSCP). Sin embargo, requiere conocer previamente las secuencias de las especies que se pretenden diferenciar, a fin de poder diseñar oligonucleótidos específicos para cada una de ellas.

V.1.6. TÉCNICA DE PCR UTILIZANDO EL GEN α -ACTINA

La actina es una de las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución y se encuentra en todas las células eucariotas (Zakut y col., 1982). Las actinas son proteínas globulares que polimerizan en filamentos e intervienen en la motilidad y estructura celular, y en la contracción y relajación muscular a través del Ca^{2+} (Pollard y Cooper, 1986). Esta proteína multifuncional está codificada por una proteína multigénica en animales, protozoos y plantas, y tiene seis isoformas en vertebrados, entre las que se incluyen dos actinas citoplasmáticas (β y γ) y cuatro tipos de proteínas musculares α -actina (esquelética, cardíaca, del músculo liso de la aorta y estomacal) (Vandekerckhove y Weber, 1979).

Se han realizado varios estudios para analizar las características y posición de los intrones y exones a lo largo de la secuencia codificadora de esta proteína (Weber y Kabsch, 1994). El número total de intrones del gen de la actina puede variar entre cero y ocho, dependiendo de las especies.

En las bases de datos están disponibles las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican las actinas en varias especies, entre las que se incluyen las de la especie humana (Taylor y col., 1988), ratón (Hu y col., 1986; Leader y col., 1986), rata (Zakut y col., 1982), pollo (Fornwald y col., 1982; Carroll y col., 1986), cerdo (Reecy y col., 1996), vaca (Davey y col., 1995), carpa y carpín (Watabe y col.,

1995). Aunque las secuencias codificadoras de los genes de las distintas actinas son muy conservadas, sus intrones varían en posición y tamaño. Esta propiedad ha hecho posible la utilización del gen de la actina muscular para la identificación de especies, ya que diseñando cebadores en regiones conservadas, se pueden amplificar fragmentos con diferentes perfiles electroforéticos, debido a las diferencias en los tamaños de los intrones. De este modo, se ha conseguido identificar carne de varias especies, como vaca, oveja y caballo (Fairbrother y col., 1998a), y también pollo y pavo (Hopwood y col., 1999; Lockley y Bardsley, 2002).

Los cebadores empleados en este trabajo (Act2 y Act4), diseñados por Watabe y col., (1995) sobre regiones conservadas de los genes de la α -actina de varias especies animales, amplificaron un fragmento de 985 pb, 983 pb, 1.000 pb y 707 pb a partir de las muestras de oca, pato mulard, pollo y cerdo, respectivamente (*Figura 38*).

Para verificar la identidad de los amplicones obtenidos, las secuencias de los productos de PCR de oca, pato mulard, pollo y cerdo se compararon entre sí, y también con las secuencias del ADNc que codifican la actina muscular humana (M20543), de ratón (M12866), de vaca (U02285), de pollo (M13756) y de cerdo (U16368), obtenidas de la base de datos GenBank/EMBL. Tras esta comparación, se llegó a la conclusión de que las secuencias de los amplicones obtenidos a partir de oca, pato mulard, pollo y cerdo fueron similares a las secuencias del gen α -actina con las que se compararon, aunque de distinta longitud (*Figura 40*). Esto fue debido a que los amplicones de la oca, el pato mulard y el pollo contenían tres intrones y cuatro exones, mientras que el amplicón de cerdo carecía del primer intrón. Otros autores han obtenido resultados similares en relación con la inserción de intrones en posiciones conservadas de este fragmento del gen α -actina en humanos, rata, ratón y pollo (Fornwald y col., 1982; Zakut y col., 1982; Hu y col., 1986; Taylor y col., 1988).

Para llevar a cabo la diferenciación de oca, pato, pollo y cerdo, se diseñaron cuatro cebadores directos específicos de especie (ActG, ActD, ActP y ActC) en las regiones correspondientes a los intrones. La selección de los intrones como diana para la hibridación de cebadores específicos, se debió a que estas regiones presentan una elevada variabilidad interespecífica y, además, a que el diseño de

cebadores en estas regiones puede evitar la amplificación de pseudogenes. La combinación de los cebadores específicos con el cebador inverso conservado *actinv*, localizado en el cuarto exón, permitió la amplificación por PCR de regiones de longitud específica del gen de la α -actina en las especies analizadas.

Por otro lado, las bandas de menor tamaño amplificadas en el ADN de oca y pollo (aproximadamente 521 pb) y el fragmento de 707 pb amplificado en el ADN de cerdo (*Figura 38*), corresponden probablemente a la amplificación de pseudogenes, ya que las secuencias de estos fragmentos carecen de uno o más intrones. La amplificación de pseudogenes cuando se usan cebadores diseñados en las secuencias de las regiones conservadas de los exones es un fenómeno conocido (Slade y col., 1993). Como ejemplos se pueden citar la amplificación de pseudogenes del gen actina en pollo (Schwartz y Rothblum, 1980) y plantas del género *Petunia* (McLean y col., 1990), así como la amplificación de pseudogenes nucleares de fragmentos del gen citocromo b en especies de caza (Perna y Kocher, 1996; Burgener y Hübner, 1998), entre otros. La amplificación de genes que carecen de algún intrón (pseudogenes) puede deberse a que se amplifican con mayor eficiencia al ser mucho más cortos. No obstante, los pseudogenes se consideran secuencias apropiadas para el estudio de especies muy relacionadas, ya que son secuencias en las que se produce una rápida sustitución y homogenización (Slade y col., 1993).

En este trabajo se ha comprobado que la secuencia de 474 pb, excluyendo cebadores e intrones, del producto de PCR de pollo, difiere en 77 nucleótidos de la de cerdo, en 24 nucleótidos de la de pato mulard y solamente en 20 nucleótidos del producto de PCR de la oca. Asimismo, el producto de PCR de cerdo difiere en 73 nucleótidos del de pato y en 71 nucleótidos del producto de PCR de la oca. Los productos de PCR de la oca y el pato mulard sólo difieren en 7 nucleótidos. Sin embargo, al comparar las secuencias aminoacídicas, se observó que no existen diferencias entre las secuencias de aminoácidos codificadas en el pollo y la oca, y tan sólo varía un aminoácido entre las secuencias de oca y pato mulard (la posición 95, codifica para el aminoácido treonina en el pato y para el aminoácido isoleucina en la oca). Por otro lado, la secuencia aminoacídica del producto de PCR de cerdo difiere en 9 aminoácidos respecto a la secuencia de oca. Estos resultados corroboran que la secuencia proteica de cada isoforma de la actina está

conservada en mamíferos (humanos y roedores) y en aves (Mounier y col., 1992) y sugiere que el producto de PCR obtenido en cerdo con los cebadores Act2 y Act4 es un pseudogen.

Los perfiles electroforéticos generados con cada uno de los cebadores específicos diseñados en el gen de la α -actina (*Figuras 42 y 43*) permitieron la diferenciación inequívoca de las muestras de oca, pato mulard, pollo y cerdo (Rodríguez y col., 2003b, 2003c). El límite de detección del método se determinó mediante la amplificación por PCR de ADN obtenido a partir de mezclas binarias que contenían un 100, 50, 25, 10, 5, 1 y un 0,1% de la especie diana. Las *Figuras 44-46* muestran como en todas las especies, a medida que el porcentaje de la especie diana se reduce en la mezcla, se obtiene una banda de amplificación menos intensa con los cebadores específicos de especie. El límite de detección del ensayo (porcentaje más pequeño que produce una amplificación visible de ADN) fue del 1% o incluso inferior para todas las especies analizadas en las mezclas (*Figuras 44-46*). Además, se determinó un límite de detección del 0,1% en las mezclas de hígado de pollo en pato u oca (*Figuras 45A y 45B*) y en las mezclas de hígado de cerdo en pato u oca (*Figuras 46A y 46B*). El límite de detección no se modificó cuando se analizaron muestras pasteurizadas (*Figura 44B*) o esterilizadas (*Figura 44C*). No se obtuvieron productos de PCR inespecíficos o inhibiciones al analizar muestras que contenían mezclas de varias especies.

Debido a su sencillez, especificidad y sensibilidad, la amplificación de los fragmentos seleccionados del gen de la α -actina empleando oligonucleótidos específicos de especie (ActG, ActD, ActC y ActP), junto con el cebador *actinv*, es una técnica cualitativa/semicuantitativa eficaz para identificar la presencia de oca, pato mulard, pollo y cerdo en mezclas cárnicas, incluso a niveles bajos de sustitución. Además la interpretación inequívoca de los resultados se puede realizar visualmente, sin necesidad de emplear instrumentos complejos. Si lo comparamos con técnicas alternativas como la secuenciación directa de los productos de PCR, PCR-RFLP, PCR-SSCP, RAPD o la hibridación de ADN con sondas específicas, la reacción de PCR ofrece las ventajas de ser más barata, más rápida y más útil para el análisis rutinario de un gran número de muestras. Esta técnica se puede emplear en programas de inspección para asegurar el

cumplimiento de las normas de etiquetado y garantizar la autenticidad en el *foie gras* y en otros productos cárnicos.

V.1.7. TÉCNICA DE PCR UTILIZANDO EL GEN 12S ARNr

En este trabajo, se escogió el gen mitocondrial 12S ARNr porque tiene un tamaño y un grado de mutación apropiados para la identificación de especies. Además, en las bases de datos existen secuencias de este gen correspondientes a diversas especies animales (Mindell y col., 1997; Hiendleder y col., 1998; Lin y col., 1999; Feligini y Parma, 2003). Por ello, algunos investigadores han empleado el gen 12S ARNr para identificar especies animales mediante técnicas de PCR, PCR-RFLP o PCR-Secuenciación.

Borgo y col., (1996), seleccionaron un fragmento de 380 pb del gen mitocondrial 12S ARNr para identificar, mediante PCR-RFLP, tres especies de caracol (*Helix pomatia*, *Helix lucorum* y *Achatina fulica*). Bellagamba y col., (2003) emplearon el gen 12S ARNr para la amplificación mediante PCR de fragmentos de ADN específicos de rumiantes (231pb), cerdo (186 pb) y aves de corral (256 pb) con el fin de detectar tejidos de estas especies en harinas de pescado. El límite de detección del ensayo en las harinas analizadas fue del 0,125% para las muestras de vaca, oveja, cerdo y pollo y del 0,5% para las muestras de cabra. Asimismo, han desarrollado una técnica de PCR múltiple para la detección simultánea de tejidos de rumiantes y cerdo, con un límite de detección de 0,25%.

Bottero y col., (2003) desarrollaron una técnica de PCR múltiple, utilizando los genes mitocondriales 12S y 16S ARNr, para identificar la presencia de vaca, oveja y cabra en muestras de leche y queso, con un límite de detección del 0,5%. Sun y Lin (2003) utilizaron la técnica de PCR-RFLP, para identificar carne de vaca, cerdo y cabra, utilizando el gen 12S ARNr. El límite de detección del ensayo al analizar mezclas cárnicas fue del 1%. Finalmente, Girish y col., (2004) utilizaron la técnica de PCR-Secuenciación para identificar carne de distintas especies de rumiantes, amplificando un fragmento de 456 pb en el gen mitocondrial 12S ARNr.

En este trabajo, utilizando los cebadores 12SFW y 12SREV diseñados a partir de las secuencias obtenidas en la base de datos GenBank/EMBL, se amplificó un fragmento de ADN de 392 pb, 394 pb, 402 pb, 404 pb y 400 pb a partir de las

muestras de oca, pato, pollo, cerdo y pavo, respectivamente (*Figura 47*). Asimismo, la pareja de cebadores 12SFWM y 12SSEQ permitió la amplificación de un fragmento de 400 pb, 399 pb, 398 pb y 397 pb a partir de las muestras de cerdo, vaca, oveja y cabra, respectivamente (*Figura 48*).

La secuenciación de estos fragmentos y la posterior comparación de las secuencias obtenidas con las del gen 12S ARNr de pato, pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra procedentes de la base de datos GenBank/EMBL, permitió comprobar la identidad de los productos amplificados (*Figuras 50 y 51*).

Las secuencias del gen 12S ARNr obtenidas de los productos de PCR de oca, pato mulard, pollo, pavo y cerdo se emplearon para diseñar un cebador inverso específico para cada especie. La combinación de los cebadores específicos de oca (12SG), pato (12SD), pollo (12SC), pavo (12ST) y cerdo (12SS), con el cebador directo 12SFW, permitió la amplificación por PCR de regiones de longitud específica del gen 12S ARNr en las cinco especies analizadas, sin producir reacciones cruzadas o inespecíficas cuando estos cebadores específicos se enfrentaron con ADN de otras especies como vaca, oveja, cabra, caballo y conejo (*Figura 52*).

Las secuencias del gen 12S ARNr obtenidas de los productos de PCR de vaca, oveja, cabra y cerdo se emplearon para diseñar un cebador inverso específico para cada especie. La combinación de los cebadores específicos de vaca (12SBT), oveja (12SOA), cabra (12SCH) y cerdo (12SS), con el cebador directo común 12SFWM, permitió la amplificación por PCR de regiones de longitud específica del gen 12S ARNr en estas cuatro especies. Cuando se analizaron muestras sometidas a tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización, se pudo comprobar que dichos tratamientos no afectan al resultado obtenido. Tampoco se detectaron reacciones cruzadas o inespecíficas cuando estos cebadores se enfrentaron con ADN de otras especies como oca, pato, pollo, caballo y conejo (*Figura 53*).

Los perfiles electroforéticos generados con cada uno de los cebadores específicos diseñados (*Figuras 52 y 53*) permitieron la diferenciación inequívoca de las muestras de oca, pato mulard, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra en el gen mitocondrial 12S ARNr (Rodríguez y col., 2003a, 2004a).

El límite de detección del método se determinó mediante la amplificación por PCR de ADN obtenido de mezclas binarias que contenían un 100, 50, 25, 10, 5, 1 y un 0,1% de la especie diana (*Figuras 54-57*) o un 100, 10, 5, y un 1% de la especie diana (*Figuras 58-61*). Las *Figuras 54-61* muestran como en todas las especies, a medida que el porcentaje de la especie diana se reduce en la mezcla, se obtiene una banda de amplificación menos intensa con los cebadores específicos de especie. El límite de detección del ensayo (porcentaje más pequeño que produce una amplificación visible de ADN) fue del 1% o incluso inferior para todas las especies analizadas en las mezclas (*Figuras 54-61*), llegando al 0,1% para la detección de hígado de pollo (*Figuras 54A y 54B*) o hígado de cerdo (*Figuras 55A y 55B*). El límite de detección no se modificó cuando se analizaron muestras pasteurizadas (*Figura 54C, 59B y 60B*) o esterilizadas (*Figura 54D, 59C y 60C*).

Una consideración a tener en cuenta es la variable cantidad de ADN mitocondrial por gramo que encontramos en los diferentes tipos de tejidos analizados (músculo, hígado y grasa). El contenido de mitocondrias en las células hepáticas y, por ello, el contenido de ADN mitocondrial, es aproximadamente tres veces superior al de las células musculares (Altman y Katz, 1976; Schultz y col., 1998). Este hecho puede explicar porqué el límite de detección inferior de las mezclas binarias que incluyen músculo de pavo o grasa de cerdo en el ensayo es del 1% (*Figuras 55C, 56A y 56B*), mientras que el límite de detección de las mezclas que contienen hígado de cerdo o de pollo es posible cuando solo hay un 0,1% de los mismos en la mezcla.

Además, el *foie gras* es un alimento que se obtiene sometiendo a las ocas y los patos a una dieta especial. La sobrealimentación de estos animales en las últimas semanas de su ciclo de producción produce un aumento del tamaño de su hígado debido a la hipertrofia de los hepatocitos, hecho que no ocurre en otros tipos de células (Lapie y Tournut, 1970). La esteatosis hepática es un proceso reversible (Hermier, 1997) provocado por un incremento en la síntesis de lípidos, aunque la multiplicación de hepatocitos (hiperplasia) nunca se ha demostrado. Por ello, la relación ADN/peso del tejido en el *foie gras* es inferior a la de un hígado de la misma especie que no ha sido sometido a una sobrealimentación.

De todo lo anteriormente expuesto, se deduce que el análisis del gen 12S ARNr mediante la técnica de PCR utilizando cebadores específicos de especie constituye

una herramienta sensible y fiable para la identificación específica de oca, pato mulard, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra en *foie gras* y mezclas cárnicas, incluso a bajos niveles de sustitución. Además, el método permite la detección semicuantitativa de oca, pato mulard, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra en productos que contienen diferentes tejidos (hígado, músculo y grasa) o que han sido sometidos a diferentes tratamientos térmicos.

Por otra parte, la interpretación inequívoca de los resultados se puede realizar visualmente, sin la necesidad de emplear instrumentos complejos. La técnica de PCR empleando cebadores específicos de especie se puede emplear en programas de inspección para asegurar el cumplimiento de las normas de etiquetado y garantizar la autenticidad en el *foie gras* y en otros productos cárnicos, ya que combina rapidez, sensibilidad y bajo coste, lo que la convierte en una alternativa interesante a otras técnicas basadas en el análisis del ADN, como la secuenciación, PCR-RFLP, PCR-SSCP, RAPD o la hibridación de ADN, para su aplicación como método rutinario de identificación de especies.

V.1.8. TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL

En la actualidad, los grandes avances logrados en las técnicas de biología molecular han permitido el desarrollo de numerosas técnicas genéticas que se han aplicado con éxito al análisis de alimentos. La posibilidad de monitorizar en tiempo real el progreso de la reacción de PCR ha revolucionado las técnicas de cuantificación del ADN y del ARN. Los sistemas en tiempo real se caracterizan por detectar la amplificación de un producto de PCR a medida que se produce y no por medir la cantidad de producto de PCR generado tras un número determinado de ciclos. Así, cuanto mayor sea el número inicial de copias del ácido nucleico diana antes se detectará un incremento en la fluorescencia como consecuencia del acúmulo de productos de PCR.

La técnica de PCR cuantitativo en tiempo real es una técnica capaz de detectar y cuantificar secuencias de ácidos nucleicos. Su principio básico incluye el uso de agentes intercaladores fluorescentes de la doble cadena de ADN, que detectan la presencia o ausencia de amplicones, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados, o de diversos tipos de sondas fluorescentes (Taqman®, "*molecular beacons*" y "*scorpions*") que hibridan específicamente en la

secuencia del ADN diana y evitan la posibilidad de producir falsos positivos si aparecen productos de PCR inespecíficos o dímeros de cebadores.

En condiciones ideales, un método cuantitativo debe ser rápido, sencillo y económico. Además, la automatización del proceso es esencial en su desarrollo. En este sentido, la cuantificación de productos de PCR mediante la utilización de técnicas de PCR cuantitativo en tiempo real está adquiriendo cada vez más importancia, ya que ha demostrado ser una alternativa relativamente sencilla y eficaz a otras técnicas de análisis más lentas y laboriosas (Ahmed, 2002). La técnica de PCR cuantitativo en tiempo real, además de sus numerosas aplicaciones en el campo del diagnóstico clínico y de la investigación básica, ha demostrado su eficacia en el análisis de alimentos, principalmente en la detección y cuantificación de organismos modificados genéticamente (OMG) (Brodmann y col., 2002; Shindo y col., 2002; Zeitler y col., 2002; Terzi y col., 2003; Hernández y col., 2004), la detección de microorganismos patógenos y alterantes (Filion y col., 2003; Jothikumar y col., 2003; Krumbholz y col., 2003; Rodríguez-Lázaro y col., 2003; Bhagwat, 2004), así como en el control de la autenticidad y trazabilidad de los alimentos (Brodmann y Moor, 2003; Rehbein y Horstkotte, 2003; Sawyer y col., 2003; Sotelo y col., 2003; Walker y col., 2003, 2004).

Los métodos desarrollados para la detección de OMG se basan principalmente en la utilización de sondas Taqman®, aunque también se han empleado los cebadores *Scorpion* (Terry y Harris, 2001). El sistema de sondas Taqman® emplea dos conjuntos de cebadores y sonda: uno para la cuantificación total del producto analizado, basado en la detección de un gen monocopia que se usa como control endógeno, y otro para la detección específica de secuencias transgénicas (Vaïtilingom y col., 1999; Brodmann y col., 2002; Shindo y col., 2002). Se trata de una cuantificación relativa que no requiere el empleo de una recta estándar para cada secuencia diana, ya que lo que se pretende es conocer el número de copias del transgén con relación al número total de copias del genoma del maíz o soja. La cuantificación se obtiene al establecer la relación entre el ADN transgénico y el ADN total.

A diferencia de lo que sucede en la cuantificación de los OMG, la enumeración de microorganismos presentes en los alimentos es una cuantificación absoluta, que

requiere la preparación de una recta estándar de diluciones seriadas a partir de muestras con un número inicial conocido de copias del genoma de interés, pero que no emplea un control endógeno (Filion y col., 2003; Krumbholz y col., 2003; Bhagwat, 2004). Así, se puede conocer el número de copias de una muestra desconocida, interpolando en la recta estándar el valor de C_t obtenido en el análisis. La precisión en la determinación del número de copias de una secuencia específica depende de la sensibilidad y repetibilidad de la amplificación por PCR y de la presencia de inhibidores en la muestra.

La identificación de especies mediante la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (Brodmann y Moor, 2003; Rehbein y Horstkotte, 2003; Sawyer y col., 2003; Walker y col., 2003, 2004) requiere del empleo de rectas estándar y del uso de un control endógeno para evitar variaciones en el nivel de amplificación del ensayo, como consecuencia de la degradación del ADN o de la presencia de inhibidores en la muestra.

Las técnicas de PCR convencionales permiten la detección cualitativa de distintas especies animales en una mezcla, pero para cuantificar los porcentajes de incorporación de una especie en un producto, es necesario emplear técnicas de PCR competitivo (Wolf y Lüthy, 2001; Frezza y col., 2003), densitometría (Calvo y col., 2002b) o PCR cuantitativo en tiempo real. Estas últimas apenas se han utilizado para la identificación de especies en alimentos destinados al consumo humano (Brodmann y Moor, 2003; Rehbein y Horstkotte, 2003; Sawyer y col., 2003; Sotelo y col., 2003; Walker y col., 2003, 2004), aunque se ha empleado con éxito para detectar ADN bovino en harinas de carne y huesos destinadas a la alimentación animal (Lahiff y col., 2002).

En esta tesis doctoral, se ha desarrollado una técnica de PCR cuantitativo en tiempo real, mediante la amplificación de fragmentos del gen mitocondrial 12S ARNr, con el fin de establecer una relación cuantitativa entre los valores de C_t obtenidos y el porcentaje de incorporación de *foie gras* de pato en mezclas binarias de *foie gras* pato/oca. Asimismo, se ha desarrollado una técnica de PCR cuantitativo en tiempo real para cuantificar el porcentaje de tejido muscular de cerdo en mezclas binarias de tejido muscular cerdo/vaca.

V.1.8.1. CUANTIFICACIÓN DE ADN DE PATO EN MEZCLAS BINARIAS PATO/OCA

Para cuantificar la presencia de pato en *foie gras* se diseñaron dos parejas de cebadores, que permitieron la amplificación de un fragmento específico de pato y de un fragmento común para pato y oca, que se empleó como control endógeno (ver sección III.2.9.3.1). La principal ventaja del empleo de un control endógeno (sistema de PCR pato+oca) radica en que determinados factores como la presencia de inhibidores de la reacción, la integridad y la calidad del ADN recuperado de una muestra, que afectan al nivel de amplificación en el ensayo, se pueden tener en cuenta al comparar el valor de C_t obtenido en la muestra problema con la respuesta de amplificación obtenida utilizando la recta estándar de referencia. Este hecho tiene un enorme interés dada la variabilidad observada en las condiciones con que se recupera el ADN de los alimentos, en función de su estado de conservación y del tratamiento al que se haya sometido el producto.

Los datos de fluorescencia obtenidos al final de cada ciclo de amplificación para cada muestra en los sistemas de PCR específico y control endógeno, se analizaron estadísticamente como se indica en la sección III.2.9.6.1, con el fin de evaluar la especificidad, sensibilidad y linealidad del ensayo.

Los resultados obtenidos en la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real al analizar ADN procedente de diversas especies animales, pusieron de manifiesto la especificidad de los sistemas de PCR específico de pato y del control endógeno pato+oca diseñados. Sin embargo, no fue posible la cuantificación de otras especies animales como pollo y cerdo, debido a la falta de amplificación de los ADNs de estas especies cuando se empleó el sistema de PCR cuantitativo en tiempo real diseñado.

Para conocer la sensibilidad del sistema (mínima cantidad de ADN de pato que es posible detectar mediante la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real), se analizaron 3 tipos de muestras: ADN plasmídico que contiene la secuencia diana del gen 12S ARNr de pato, diluciones de ADN extraído de *foie gras* de pato y ADN extraído de mezclas binarias experimentales de *foie gras* pato/oca, que contenían un 25, 10, 1 y 0,1% de pato.

Cuando se analizaron los tres tipos de muestras, se observó que a medida que aumenta el porcentaje de ADN de pato en las muestras, disminuye el valor C_t en el ensayo de PCR cuantitativo en tiempo real (*Figuras 63 y 64*). El límite de detección del sistema de PCR específico de pato fue de 0,001 ng de ADN de esta especie cuando se empleó ADN plasmídico (*Figura 63A*) y cuando se realizaron las diluciones de ADN de *foie gras* de pato (*Figura 63B*), mientras que el límite de detección de pato en las mezclas binarias (mínimo porcentaje de pato que es posible detectar en las mezclas de *foie gras* pato/oca) fue del 0,1%. Sin embargo, al considerar los parámetros de linealidad de la técnica, el límite de cuantificación (mínimo porcentaje de pato que es posible cuantificar en mezclas pato/oca) fue del 1% (Rodríguez y col., 2004b).

Para comprobar la linealidad de la respuesta (C_t) con relación al porcentaje de pato en la mezcla, los valores de C_t se representaron frente al logaritmo de las concentraciones de ADN de pato (*Figura 65*). Los valores obtenidos para la “C” de Cochran indican que las varianzas de las respuestas obtenidas para cada concentración de pato en las mezclas frescas, pasteurizadas y esterilizadas son homogéneas (*Figuras 65 y 66*) en el intervalo comprendido entre 1 y 25%.

Sin embargo, los resultados obtenidos indican que el tipo de tratamiento térmico de la muestra influye en las ecuaciones de cuantificación del porcentaje de la especie diana. En consecuencia, la cuantificación de diferentes especies en productos alimenticios en general, y en *foie gras* en particular, precisa de la preparación de diferentes rectas de calibrado en función del tratamiento térmico de las muestras. Por ello, en este trabajo se han realizado diferentes rectas de calibrado para cada una de las mezclas binarias preparadas (*foie gras* fresco, *foie gras* pasteurizado y *foie gras* esterilizado de pato y oca) (*Figura 66*).

V.1.8.2. CUANTIFICACIÓN DE ADN DE CERDO EN MEZCLAS BINARIAS CERDO/VACA

El desarrollo de una técnica de PCR cuantitativo en tiempo real para la cuantificación de cerdo en mezclas cerdo/vaca se ha abordado en este trabajo con un doble objetivo:

Por una parte, la detección de carne de cerdo en carnes frescas y productos cárnicos es importante para garantizar el etiquetado correcto de estos productos, especialmente para los grupos de población que por motivos de salud o religiosos-culturales no pueden consumir carne o despojos procedentes de esta especie animal.

Por otra parte, el desarrollo de esta técnica se ha llevado a cabo como modelo para la cuantificación de otras especies animales en productos cárnicos en el futuro, debido a que actualmente son muy escasas las referencias bibliográficas sobre este tema.

Para llevar a cabo este objetivo y tomando como punto de partida la experiencia adquirida en la cuantificación de pato en mezclas de *foie gras*, se realizaron mezclas de tejido muscular que contenían porcentajes de cerdo en vaca comprendidos entre 0,5 y 5%, y se sometieron a un tratamiento de esterilización en autoclave a 120°C durante 20 min.

Se diseñaron dos parejas de cebadores, que permitieron la amplificación de un fragmento específico de cerdo y de un fragmento común para cerdo, vaca, oveja y cabra, que se empleó como control endógeno (ver sección III.2.9.3.2). La validación del ensayo de cuantificación de ADN de cerdo en mezclas cerdo/vaca mediante PCR cuantitativo en tiempo real, se basó en el estudio de su especificidad, sensibilidad y linealidad.

La especificidad de los sistemas de PCR específico de cerdo y control endógeno de mamíferos quedó demostrada mediante el análisis de ADN procedente de diversas especies animales.

Asimismo, para establecer el límite de detección del ensayo se analizaron diluciones decimales seriadas de ADN plasmídico que contenían la secuencia parcial del gen 12S ARNr de cerdo. Los resultados obtenidos muestran que la cantidad mínima de ADN de cerdo que es posible detectar mediante la técnica desarrollada es de 0,01 ng (*Figura 68*). Cuando se analizaron diferentes porcentajes de tejido muscular de cerdo (5, 1 y 0,5%) en mezclas binarias cerdo/vaca (*Figura 69*), se observó que a medida que aumenta el porcentaje de sustitución de tejido muscular de cerdo en las mezclas, disminuye el valor C_t en el

ensayo de PCR cuantitativo en tiempo real y que es posible detectar la presencia de cerdo incluso en las mezclas que contienen un 0,5% de esta especie, tanto en mezclas binarias frescas como esterilizadas.

Como conclusión decir que los valores de C_t obtenidos a partir de mezclas de composición conocida, una vez normalizados con relación a los de la recta estándar, permiten la cuantificación de tejido muscular de cerdo en tejido muscular de vaca en el intervalo comprendido entre 0,5-5% en mezclas binarias frescas (*Figura 71A*) y esterilizadas (*Figura 71B*), pero para cuantificar las diferentes especies animales que integran un producto (carnes picadas, patés, etc.), así como para cuantificar productos que han sido sometidos a distintos tratamientos térmicos, es necesario realizar diferentes rectas de calibrado en función del tipo de producto y del tratamiento térmico de la muestra.

V.1.8.3. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL

La técnica de PCR cuantitativo en tiempo real utilizando sondas fluorescentes, presenta importantes ventajas con relación a otras técnicas de PCR cuantitativo en el análisis rutinario de los alimentos: (a) elevada especificidad, ya que toda la fluorescencia generada por la sonda procede exclusivamente de la amplificación específica del producto de PCR; (b) elimina el uso de carcinógenos potenciales como el bromuro de etidio, así como la necesidad de utilizar sistemas electroforéticos, por lo que el tiempo necesario para obtener resultados se reduce; (c) al realizarse todo el proceso en el mismo tubo se minimizan las posibilidades de contaminación con ADN exógeno y se facilita la automatización; (d) el equipo proporciona en tiempo real, según transcurre la reacción de PCR, un resultado no cualitativo, sino numérico, que permite la cuantificación y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos, y (e) en los ensayos de PCR cuantitativo se emplea el C_t , y no la cantidad de producto de PCR acumulado al final de la amplificación, como medida fiable del número de copias inicial de ADN diana. Esto se debe a que el valor del C_t , que se registra en cada ciclo de la PCR, se obtiene cuando la reacción está en la fase exponencial y ningún componente de la reacción está limitado, por lo que los valores de C_t obtenidos son muy reproducibles en reacciones con el mismo número de copias iniciales (Lahiff y col., 2002). Por el contrario, la cantidad

de producto de PCR acumulado al final de la reacción es muy sensible a pequeñas variaciones en los componentes de la reacción, ya que las medidas a tiempo final se realizan normalmente cuando la reacción ya ha superado la fase exponencial y la presencia de algún componente en concentración limitante podría afectar a la cantidad de producto final. Así, por ejemplo, la formación de dímeros de cebadores puede consumir reactivos en algunos tubos, y una muestra con mayor número de copias inicial podría terminar teniendo menor concentración de productos acumulados que otra con menor número de copias inicial en la que no se hubieran producido dímeros. En las muestras problema, la cuantificación se lleva a cabo midiendo el C_t y empleando una recta estándar para determinar el número de copias inicial.

Sin embargo, el empleo de la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real para la cuantificación de especies animales en productos alimenticios en general, y en *foie gras* en particular, presenta algunas dificultades debido a las siguientes razones:

- La ausencia de una proporción constante del ADN diana en los distintos tejidos analizados. El ADN mitocondrial se presenta en cantidades variables según el tipo de tejido analizado (músculo, hígado y grasa).
- Los ingredientes que componen un producto se pueden procesar de diferentes maneras (productos compuestos por hígado cocinado, pero carne o grasa sin cocinar, etc.).
- La relación ADN/peso del tejido en el *foie gras* es inferior a la de un hígado de la misma especie que no ha sido sometido a una sobrealimentación, como consecuencia de la esteatosis hepática.
- La correcta homogenización de los productos alimenticios y el empleo de un método de extracción de ADN adecuado para obtener ADN de buena calidad en los diferentes tejidos, son otros puntos a tener a cuenta si se quiere cuantificar correctamente.

Teniendo en cuenta los resultados alcanzados en este trabajo, se puede afirmar que la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real es una técnica rápida, sensible y fiable, que puede llegar a tener un gran interés en programas de inspección para asegurar el cumplimiento de las normas de etiquetado y garantizar la identificación

y cuantificación específica de pato en *foie gras* y en otros productos cárnicos. Asimismo, la técnica desarrollada para la cuantificación de cerdo en mezclas cárnicas permitió detectar y cuantificar bajos niveles de sustitución en las mezclas binarias analizadas.

En comparación con la técnica de PCR cualitativa desarrollada en el gen 12S ARNr que permitió la identificación de oca, pato mulard, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra en productos compuestos por diferentes tejidos (hígado, músculo y grasa) o que han sido sometidos a diferentes tratamientos térmicos, la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real presenta un límite de detección similar al de la citada técnica de PCR convencional, pero permitió no sólo la detección sino la cuantificación de pato y cerdo en muestras de *foie gras* de oca y tejido muscular de vaca, respectivamente. Sin embargo, esta técnica tampoco hizo posible determinar el origen tisular del ADN detectado.

El empleo de la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real para la identificación de especies animales constituye un trabajo pionero y de gran originalidad que serviría de complemento a las técnicas de PCR convencional. Esta técnica es todavía novedosa y resulta cara, pero su implantación progresiva en los laboratorios de análisis permitirá desarrollar un gran número de aplicaciones potenciales en el análisis de los alimentos. En la actualidad, debido a su elevado coste, tiene especial interés en productos de alto valor añadido, como el *foie gras*, donde las prácticas fraudulentas tienen mayor repercusión económica.

V.2. IDENTIFICACIÓN DE OCA Y PATO MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

De todas las técnicas de identificación de especies animales basadas en el análisis de proteínas, las técnicas de ELISA son las más utilizadas. Las técnicas de ELISA son métodos analíticos sencillos y eficaces, cuyos reactivos se pueden comercializar en forma de *kits* miniaturizados (Hsieh y col., 1995; Hajmeer y col., 2003). Si bien las técnicas genéticas son las más específicas y sensibles para la identificación de especies (Branciarri y col., 2000a; Saez y col., 2004), su puesta a punto en un laboratorio de análisis requiere una cierta infraestructura, tanto de equipamiento como de personal cualificado. Las técnicas inmunológicas, por el contrario, son más baratas y requieren menor equipamiento.

Las técnicas de ELISA se han aplicado a la identificación de diversas especies animales, entre las que se incluyen el pollo (Martín y col., 1988a; Hsieh y col., 1995), el caballo (Martín y col., 1988b; Sheu y Hsieh, 1998), el cerdo (Martín y col., 1988c; Chen y col., 1998; Chen y Hsieh, 2000), la vaca (Castro y col., 1990; Hsieh y col., 1998; Hajmeer y col., 2003), el cordero (Andrews y col., 1992; Hsieh y col., 1995), el pato (Billett y col., 1996), el pavo (Billett y col., 1996), y el ciervo (Andrews y col., 1992; Hsieh y col., 1998).

En este trabajo, se ha tratado de poner a punto una técnica de ELISA indirecto para la identificación de *foie gras* de oca, y pato mulard, mediante la utilización de anticuerpos tanto policlonales como recombinantes.

V.2.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

El desarrollo de inmunoensayos requiere disponer previamente de anticuerpos con especificidad y afinidad adecuadas para el antígeno objeto de investigación. Los anticuerpos policlonales proceden de una población heterogénea de linfocitos B productores de muchos tipos de anticuerpos de afinidad y especificidad variable (Rittenburg, 1990). Por otra parte, un inmunosuero policlonal se puede purificar, eliminando así aquellas poblaciones de anticuerpos que disminuyen la especificidad del inmunoensayo (Lee y Morgan, 1993).

La selección de los extractos antigénicos utilizados como inmunógenos y la especie animal empleada en la obtención de los inmunosueros determinan, junto a la pauta de inmunización, las características de los anticuerpos obtenidos (Rittenburg, 1990).

Como antígenos para la obtención de inmunosueros útiles en la identificación de especies se pueden emplear diversas fracciones proteicas. En el caso de productos no sometidos a tratamiento térmico, se han empleado como inmunógenos las proteínas séricas o las sarcoplásmicas (Martín y col., 1988a, 1988b, 1988c). El principal inconveniente que presenta el empleo de anticuerpos policlonales producidos frente a extractos proteicos solubles, reside en que en ocasiones son poco específicos y no sólo reconocen la especie frente a la cual se han producido sino también otras (Ayuso y col., 2000; Restani y col., 2002), siendo necesaria su purificación. Por otra parte, en productos procesados o tratados por

calor se han utilizado como inmunógenos proteínas termoestables especie-específicas (Chen y col., 1998, 2002; Hsieh y col., 1998; Chen y Hsieh, 2000). En este trabajo, se ha optado por utilizar como inmunógenos los extractos obtenidos a partir de las proteínas solubles del *foie gras* de las especies de oca y pato mulard.

A la hora de seleccionar la especie animal que se va a utilizar para la producción de anticuerpos hay que tener en cuenta diversos factores como la distancia filogenética con la especie de la que procede el antígeno, la disponibilidad de un número suficiente de animales y la facilidad de manejo. Las especies más utilizadas para la obtención de anticuerpos son el conejo, la cobaya, la rata y el ratón (Harlow y Lane, 1999), aunque el empleo de animales de mayor tamaño como cerdos, carneros o caballos, permite obtener grandes volúmenes de inmunosuero y durante periodos de tiempo más prolongados.

Los anticuerpos policlonales utilizados en este trabajo se obtuvieron en conejos de la raza *Nueva Zelanda*. Se seleccionaron estos animales ya que responden bien a una gran variedad de antígenos (Dunbar y Schwoebel, 1990), permiten obtener un volumen de suero suficiente para los objetivos del trabajo y además, su manejo y mantenimiento son sencillos.

Los conejos se inmunizaron con los extractos antigénicos de oca y pato mulard, emulsionados con adyuvante de Freund, alternándose inoculaciones intradérmicas e intramusculares. El adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmune de una manera inespecífica (Audibert y Lise, 1993). El mecanismo de acción de los adyuvantes es complejo e incluye una liberación lenta y prolongada del antígeno en una forma agregada, así como una activación de los linfocitos por componentes bacterianos (Hui, 1994). En concreto, el adyuvante completo de Freund se compone de células de *Mycobacterium tuberculosis* inactivadas por calor y vehiculadas en aceite de parafina y monooleato. El aceite mineral impide la dispersión y retarda el catabolismo del antígeno, proporcionando una fuente de estimulación antigénica prolongada. Por el contrario, el adyuvante incompleto de Freund carece de células de *M. tuberculosis*. Además, con las inoculaciones intradérmicas se consigue una liberación del antígeno a la sangre del animal lenta y prolongada en el tiempo, mientras que en las inoculaciones intramusculares, la

respuesta del sistema inmunológico del animal ante el antígeno es más rápida y menos duradera (Deshpande, 1996). Cuando el título del inmunosero se consideró óptimo, los conejos se sacrificaron, obteniéndose aproximadamente 300 mL de sangre de cada animal.

Los inmunoseros resultantes de la sangría final de los animales se purificaron parcialmente mediante precipitación selectiva con sulfato amónico. Este método es el más utilizado para la separación de las proteínas en solución y, en particular, para la separación de los anticuerpos o inmunoglobulinas del inmunosero total. La técnica se basa en añadir un tampón que contiene concentraciones elevadas de iones fuertemente cargados, como amonio o sulfato, a una solución en la que las proteínas se encuentran unidas a las moléculas de agua formando puentes de hidrógeno. Los iones de amonio y sulfato compiten con las moléculas proteicas por el agua, y las proteínas, al perder su unión con las moléculas de agua, disminuyen su solubilidad y precipitan.

V.2.1.1. VALORACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES

Los inmunoseros obtenidos frente a los extractos antigénicos de proteínas solubles de *foie gras* de oca (anti-oca) y pato (anti-pato), se analizaron frente a sus respectivos antígenos (oca y pato) utilizando la técnica de ELISA indirecto. Los resultados mostraron como los anticuerpos anti-oca y anti-pato reconocían de un modo similar el antígeno frente al cual se habían producido y el antígeno de la especie heteróloga (*Tabla 17*). Esta reactividad cruzada era de esperar, debido a que muchos de los determinantes antigénicos de las proteínas extraídas del *foie gras* pueden ser comunes en las dos especies analizadas. Así, teniendo en cuenta que los extractos antigénicos utilizados para la inmunización contenían todas las proteínas solubles extraídas de las muestras de *foie gras*, los conejos no sólo produjeron anticuerpos frente a los epítomos especie-específicos, sino también frente a aquellos que presentan características comunes en las dos especies. Por tanto, antes de ser utilizados para la identificación de especies, se debían eliminar los anticuerpos inespecíficos de los inmunoseros. La eliminación de reacciones cruzadas se puede conseguir mediante técnicas de cromatografía de afinidad o mediante técnicas de inmunoadsorción (Harlow y Lane, 1999).

La purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad consiste en hacer pasar los inmunoseros por columnas que contienen como ligandos de afinidad las proteínas heterólogas frente a las que se producen reacciones cruzadas, recogiendo así los anticuerpos específicos en una última columna que contiene las proteínas de la especie frente a la que se obtuvo el inmunosero (Harlow y Lane, 1999).

Como alternativa a la cromatografía de afinidad, se puede recurrir a la técnica de inmunoadsorción, que consiste en mezclar los inmunoseros con los extractos antigénicos de las especies heterólogas con el fin de bloquear los anticuerpos que reconozcan epítomos en dichos extractos, manteniéndose activos los anticuerpos frente a determinantes antigénicos específicos (Harlow y Lane, 1999). Una vez que se neutralizan los inmunoseros para eliminar las reacciones cruzadas, los complejos antígeno-anticuerpo que se forman durante la neutralización no interfieren en el ensayo inmunoenzimático, ya que se eliminan junto con los anticuerpos no reaccionantes del inmunosero al lavar los pocillos de las placas de ELISA.

Esta técnica es más sencilla y económica que la cromatografía de afinidad, y se ha utilizado con éxito para la identificación específica de animales de abasto. Así, Martín y col., (1988a, 1988b, 1988c) eliminaron mediante la técnica de inmunoadsorción las reacciones cruzadas de los anticuerpos policlonales producidos frente a las proteínas solubles de cerdo, caballo y pollo. Del mismo modo, Carrera y col., (1996), Céspedes y col., (1999a), Fernández y col., (2002) y Asensio y col., (2003) utilizaron la técnica de inmunoadsorción para eliminar las reacciones cruzadas de los sueros policlonales obtenidos frente a extractos musculares de diversos pescados ahumados, peces planos y especies de almejas de interés comercial, respectivamente. En otros trabajos, sin embargo, no ha sido posible eliminar las reacciones cruzadas frente a otras especies filogenéticamente cercanas (Taylor y Jones, 1992).

En este trabajo, las reacciones cruzadas de los inmunoseros policlonales anti-oca y anti-pato frente a la especie heteróloga, se trataron de eliminar mediante la técnica de inmunoadsorción. Para ello, se añadieron a los inmunoseros diferentes cantidades del extracto heterólogo, para comprobar la eficacia de la neutralización.

Sin embargo, la neutralización no consiguió eliminar la fuerte reactividad cruzada del inmunosuero anti-pato frente al extracto de oca ni la del inmunosuero anti-oca frente al extracto de pato (*Tabla 18*).

Los resultados obtenidos permiten concluir que la técnica de ELISA indirecto en placa, utilizando anticuerpos policlonales frente a las proteínas solubles de *foie gras* de oca y pato, no resultó un procedimiento adecuado para conseguir la identificación del origen biológico de muestras de *foie gras* procedentes de estas especies.

La estrecha relación filogenética existente entre el pato y la oca, y el hecho de que las proteínas solubles obtenidas a partir del *foie gras* de las dos especies puedan compartir la mayoría de los epítomos específicos, parecen ser la causa de la ausencia de resultados concluyentes que permitan diferenciar las especies productoras de *foie gras* empleando anticuerpos policlonales.

V.2.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Los últimos avances en el conocimiento de la estructura y conformación de las moléculas de anticuerpos, las tecnologías de selección *in vitro*, la mayor comprensión de la biología molecular de bacterias y virus empleados como vectores y la creación de genotecas sintéticas de fagos (Winter y Milstein, 1991; Karu y col., 1994; Hoogenboom y col., 1998) han hecho posible la obtención de anticuerpos recombinantes, mediante la amplificación de los genes que codifican las regiones variables de los anticuerpos, su inserción en fagémidos y su expresión en levaduras, insectos, plantas, hongos y *Escherichia coli*. En los últimos años se han desarrollado varios sistemas de clonación y expresión de las regiones de los anticuerpos de interés, pero de ellos, la utilización de fagémidos y su expresión en *Escherichia coli*, ha resultado ser una de las más interesantes, por la facilidad de seleccionar anticuerpos específicos y porque los genes que los codifican pueden secuenciarse y someterse a mutaciones dirigidas en el mismo vector (Little y col., 1993; Daly y col., 2001).

Los anticuerpos recombinantes obtenidos por manipulación genética, presentan las siguientes ventajas: (a) ofrecen la posibilidad de prescindir de la inmunización de animales de experimentación; (b) el proceso de obtención es más rápido y

económico que el seguido en la obtención de anticuerpos monoclonales (Charlton y col., 2001); (c) poseen la habilidad de interactuar con epítomos que no están accesibles a las moléculas convencionales de anticuerpos; (d) es posible su inmovilización en soportes como inmunotubos o inmunosensores; (e) otros grupos funcionales como péptidos, enzimas o toxinas pueden expresarse conjuntamente con los anticuerpos; (f) permiten la obtención de reactivos de afinidad y especificidad precisa, mediante la utilización de técnicas que modifiquen la estructura y características del lugar de unión del anticuerpo con el antígeno (Karu y col., 1994; Daly y col., 2001) y (g) se pueden seleccionar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de una genoteca que se unan al antígeno apropiado con gran facilidad (proceso conocido como *bio-panning*) (Charlton y col., 2001).

Los anticuerpos fueron las primeras proteínas en expresarse con éxito en la superficie de un fago (Hoogenboom y col., 1998). Estos fagos que son capaces de expresar en su superficie genotecas que contienen millones o incluso billones de diferentes péptidos o proteínas, pueden contener diferentes fragmentos de anticuerpos, cuya especificidad y afinidad son equivalentes a las de la molécula completa de anticuerpo. Así, los fragmentos Fab, Fv, dsFv y scFv (*Figura 29*) son los más utilizados debido a su pequeño tamaño y a que contienen en su estructura la zona de unión al antígeno. Sin embargo, no existen referencias del empleo de anticuerpos recombinantes para la identificación de especies animales. Actualmente estos anticuerpos se utilizan en terapéutica y en la detección de animales y plantas transgénicas (Gavilondo y Larrick, 2000).

En este trabajo de investigación, se procedió en primer lugar a la propagación de la genoteca sintética Griffin, con el fin de obtener miles de millones de fagos que expresaran en su superficie distintas combinaciones de scFv. A continuación, se procedió a seleccionar la genoteca de fagos mediante su exposición frente a los extractos proteicos solubles de oca y pato inmovilizados en inmunotubos (*bio-panning*). Para conseguir poblaciones de fagos que reconociesen “específicamente” a las proteínas de *foie gras* de oca o pato mulard se repitió la selección de la genoteca 3 veces, mediante la exposición al antígeno de oca o pato. Finalmente, las poblaciones de fagos recuperadas en cada una de las rondas de selección se evaluaron mediante una técnica de ELISA indirecto para comprobar la especificidad, sensibilidad y afinidad de los fagos “policlonales”

positivos. Asimismo, se utilizó la técnica de ELISA indirecto para evaluar las propiedades de cada uno de los fagos seleccionados, que expresan una sola combinación de scFv, denominados monoclonales. Se consideraron pocillos productores de anticuerpos recombinantes específicos frente a oca o pato, aquellos cuya absorbancia a 450 nm fuera al menos 0,8 unidades de absorbancia superior a la absorbancia obtenida en la especie heteróloga. Se consideraron pocillos negativos aquellos con valores de absorbancia similares a los de los controles negativos ($\leq 0,2$).

Desafortunadamente, empleando los extractos proteicos solubles de oca y pato y la genoteca de anticuerpos Griffin, no se obtuvieron anticuerpos recombinantes frente a epítomos específicos, ya que la mayoría de los clones positivos seleccionados frente a pato reaccionaban igualmente frente a oca y viceversa. Uno de los factores que determinan la obtención de anticuerpos de interés es el empleo de un formato de selección adecuado. Entre los formatos que se pueden utilizar para este fin, destacan el empleo de inmunotubos (formato utilizado en este trabajo), el empleo de antígenos marcados con biotina y la cromatografía de afinidad. Además, la eficiencia de la selección y la capacidad para discriminar entre fagos con diferentes afinidades a un mismo antígeno, depende de la especificidad y concentración del antígeno en la solución, de su densidad y de los tiempos de lavado (Winter y col., 1994).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, las proteínas solubles del *foie gras* de oca y pato en su conjunto no presentan un número y concentración suficiente de epítomos especie-específicos que permitan la selección de anticuerpos recombinantes que reconozcan únicamente al pato o a la oca. En consecuencia, sería preferible identificar y purificar proteínas específicas de pato u oca, o bien emplear péptidos sintéticos con los que inmunizar animales de experimentación para tratar de obtener anticuerpos recombinantes que permitieran, mediante técnicas de ELISA, la diferenciación de estas dos especies.

Como alternativas al procedimiento de selección empleado podrían utilizarse, entre otras, las siguientes:

- Separación electroforética de las distintas proteínas que componen los extractos solubles de *foie gras* de oca y pato, seguida de la comparación de las bandas

obtenidas y aislamiento de las que se consideren específicas de pato y de oca. Estas bandas proteicas con movilidad específica de cada especie, podrían emplearse para el tapizado de los inmuntubos y posterior selección de la genoteca Griffin.

- Búsqueda en las bases de datos de proteínas y de ácidos nucleicos (Swissprot, GenBank/EMBL) de secuencias peptídicas que muestren diferencias en las dos especies estudiadas. Una vez identificadas las regiones especie-específicas se sintetizarían químicamente los péptidos de interés y se emplearían en los inmuntubos para la selección de la genoteca.

Cualquiera de estas alternativas aumentarían la probabilidad seleccionar, a partir de la genoteca Griffin, fagos que expresaran fragmentos scFv capaces de diferenciar adecuadamente el *foie gras* de pato y oca.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. Utilizando el gen nuclear 5S ADNr y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un formato de PCR múltiple, se han amplificado fragmentos génicos especie-específicos que han permitido la identificación de oca y pato mulard.
2. Utilizando el gen nuclear α -actina se ha desarrollado una técnica de PCR cualitativa que ha permitido la identificación de oca, pato mulard, pollo y cerdo, mediante el empleo de cebadores directos especie-específicos y de un cebador inverso universal. La técnica permitió detectar un 1% de pato en mezclas de *foie gras* de pato/oca y hasta un 0,1% de pollo y cerdo en mezclas de estas especies con *foie gras* de pato y oca. El límite de detección fue similar cuando se analizaron muestras sometidas a distintos tratamientos térmicos.
3. Utilizando el gen mitocondrial 12S ARNr se ha desarrollado una técnica de PCR cualitativa que ha permitido la identificación de oca, pato mulard, pollo, pavo, cerdo, vaca, oveja y cabra, empleando cebadores inversos especie-específicos y un cebador directo universal. El límite de detección de la técnica fue del 1% o inferior para todas las especies analizadas en las mezclas binarias realizadas. El límite de detección no varió cuando se analizaron mezclas que contenían diferentes tejidos (hígado, músculo y grasa) o que habían sido sometidas a distintos tratamientos térmicos.
4. Empleando la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real y el marcador génico 12S ARNr se ha detectado y cuantificado la presencia de pato en mezclas binarias de *foie gras* de pato/oca, en el intervalo comprendido entre 1-25%, y de cerdo en mezclas binarias de cerdo/vaca, en el intervalo 0,5-5%. La cuantificación se ha realizado en muestras frescas, pasteurizadas y esterilizadas.
5. La utilización como inmunógeno de las proteínas solubles del *foie gras* de oca y pato no permitió la obtención de anticuerpos policlonales específicos para la diferenciación de oca y pato mediante las técnicas inmunoenzimáticas de ELISA. Estos extractos antigénicos tampoco mostraron suficientes diferencias interespecíficas que permitieran obtener anticuerpos recombinantes específicos de pato u oca a partir de la genoteca sintética Griffin.

CAPÍTULO VII

TRABAJO FUTURO

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han puesto de manifiesto algunas dificultades en la obtención de anticuerpos específicos de especie. En este contexto, ni la obtención de anticuerpos policlonales en conejos ni la selección de anticuerpos recombinantes a partir de una genoteca sintética humana (genoteca Griffin), han permitido la diferenciación de oca y pato, cuando como antígenos se emplearon las proteínas solubles extraídas del *foie gras* de dichas especies. Esta limitación induce a pensar en la necesidad del empleo de otros inmunógenos con el mismo fin.

Durante la última década, la construcción de genotecas de anticuerpos y el empleo de técnicas de selección a través de fagos se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para generar anticuerpos recombinantes “monoclonales” (Hoogenboom, 2002). La velocidad y flexibilidad con que se pueden seleccionar las genotecas compuestas por miles de millones de anticuerpos, unido a la posibilidad de expresar los anticuerpos recombinantes en bacterias ha conducido al auge de esta tecnología en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. En este campo, se han utilizado principalmente genotecas de anticuerpos de ratón y de anticuerpos humanos, como la genoteca Griffin.

Como alternativas al procedimiento de selección empleado para obtener anticuerpos recombinantes que permitan la diferenciación de especies filogenéticamente próximas como el pato y la oca podrían utilizarse, entre otras, las siguientes:

- Separación electroforética de las distintas proteínas que componen los extractos solubles de *foie gras* de oca y pato, seguida de la comparación de las bandas obtenidas y del aislamiento de las que se consideren específicas de pato y de oca. Estas bandas proteicas específicas de especie, podrían emplearse para el tapizado de los inmutubos y la posterior selección de la genoteca Griffin (García y col., 1994).
- Dado que las proteínas están codificadas genéticamente por el ADN, la búsqueda de secuencias peptídicas específicas puede basarse en el estudio de secuencias de ADN o ARN mensajero disponibles en las bases de datos especializadas (GenBank/EMBL) o en la comparación de las secuencias de aminoácidos de determinadas proteínas de las especies de interés (Rolland y col., 1993; Martínez y col., 1998) procedentes de bases de datos de proteínas como Swissprot. Una vez identificadas las regiones especie-específicas se sintetizarían químicamente los

péptidos de interés y se emplearían en los inmunotubos para la selección de la genoteca.

Cualquiera de estas alternativas aumentaría la probabilidad de seleccionar, a partir de la genoteca Griffin, fagos que expresaran fragmentos scFv capaces de diferenciar adecuadamente el *foie gras* de pato y oca.

De las numerosas proteínas inmunógenas que pueden presentar epítomos específicos de especie, en este proyecto se propone la utilización de las transaminasas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT).

Las transaminasas son enzimas específicas del hígado. La alanina aminotransferasa (ALT) está presente en grandes cantidades en el citoplasma de los hepatocitos. Por su parte, la aspartato aminotransferasa (AST) es una enzima ligada a las mitocondrias que está presente en diversos tejidos orgánicos, pero sobre todo en el hígado. Desafortunadamente, no hay secuencias disponibles de estas enzimas en las bases de datos ni para el pato mulard ni para la oca, aunque existen secuencias de otras especies como el hombre (*P24298* o *NP_002071*), el ratón (*NP_034454*) o el pollo (*P00504*). Estas secuencias podrían emplearse para el diseño de cebadores en regiones conservadas que permitirían obtener las secuencias peptídicas en las especies de interés. Una vez obtenida la secuencia peptídica de la proteína de interés, se procedería a la búsqueda de regiones específicas de especie. Los péptidos específicos de especie se emplearían como inmunógenos para la obtención de anticuerpos recombinantes.

En las bases de datos GenBank/EMBL se encuentran disponibles algunas secuencias de proteínas extraídas del hígado de pato, como la enzima citocromo C oxidasa (Pan y col., 1993) y la metalotioneína (Lee y col., 1996). También estas proteínas podrían compararse con las extraídas de otras especies para la localización de epítomos específicos.

Otro de los objetivos de esta línea de investigación, como complemento a las técnicas genéticas cuantitativas desarrolladas en esta Tesis Doctoral, sería la búsqueda de enzimas específicas de especie y de enzimas específicas de un tejido determinado, mediante el estudio de secuencias de ADN o ARN mensajero (ARNm) disponibles en las bases de datos, teniendo en cuenta que la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real, desarrollada en esta Tesis Doctoral, mediante la amplificación de fragmentos del

gen mitocondrial 12S ARNr, permite la cuantificación de ADN de pato y de cerdo en mezclas con otras especies, pero no permite determinar el origen tisular del ADN detectado.

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos proyectos para secuenciar y analizar el genoma completo de diversos organismos eucariotas, como el genoma humano (McPherson y col., 2001), de ratón (Valero y col., 2000; Watters y Dietrich, 2001) y de mosca (Rubin y col., 2000; Adams y col., 2000), así como el genoma mitocondrial de la cabra (Feligini y Parma, 2003) o del *Ansar careto* (Slack y col., 2003), entre otros. Estos estudios contribuyen a que cada vez se disponga de mayor información genética de los diversos organismos y hacen posible la identificación de regiones del genoma con diversos grados de variabilidad genética. De esta forma, mediante estudios comparativos del ADN o ARN de diversos organismos se pueden localizar proteínas o péptidos con suficiente variabilidad interespecífica para diferenciar especies filogenéticamente próximas pero con escasa variabilidad intraespecífica.

La proteómica contribuirá en gran medida a ampliar el conocimiento de la función génica en la era post-genómica (Pandey y Mann, 2000). La proteómica complementa a la genómica y proporciona una herramienta muy valiosa para el estudio a gran escala de la función génica directamente a nivel de las proteínas. Después de la revolución en la biología molecular, ejemplificada por la facilidad en el empleo de los métodos de clonación de ADN, la proteómica ayudará a una mejor comprensión de los procesos y de las rutas metabólicas, así como de la regulación de las proteínas en los próximos años.

Conociendo las secuencias de las enzimas que se expresan exclusiva o principalmente en el hígado, que pueden ser las mismas enzimas propuestas para la obtención de anticuerpos, se podrían diseñar cebadores que amplificasen los genes que las codifican. Así, tras la extracción del ARN de las especies de interés, se procedería a la producción de ADN complementario (ADNc) mediante la actividad de una transcriptasa inversa (RT). Posteriormente, el ADNc obtenido se emplearía como molde en la reacción de PCR cuantitativo en tiempo real, junto con los cebadores diseñados, y ello permitiría cuantificar no sólo la especie animal presente en una matriz compleja, sino identificar qué tejidos se han empleado como materia prima en la elaboración de un alimento.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, M.D., CELNIKER, R.A., HOLT, C.A., EVANS, J.D. y GOCAYNE, J.D. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** 287, 2271-2274.

AHMED, F.E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology** 20, 215-223.

ALTMAN, P.L. y KATZ, D.D. (1976). Bethesda: Federation of American Societies for Experimental Biology. En: *Cell Biology* (Biological Handbooks; 1), Maryland.

AN, H., MARSHALL, M.R., OTWELL, W.S. y WEI, C.I. (1989). Species identification of raw and boiled shrimp by a urea gel isoelectric focusing technique. **Journal of Food Science** 54, 233-236.

ANDERSON, S., DE BRUIJN, M.H., COULSON, A.R., EPERON, I.C., SANGER, F. y YOUNG, I.G. (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. **Journal of Molecular Biology** 156, 683-717.

ANDREWS, C.D., BERGER, R.G., MAGEAU, R.P., SCHWAB, B. y JOHNSTON, R.W. (1992). Detection of beef, sheep, deer, and horse meat in cooked meat products by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of AOAC International** 75, 572-576.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1990). *Official Methods of Analysis*, 15^a ed., Washington D.C., EE.UU., 883-889.

ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., CÉSPEDES, A., RODRÍGUEZ, M.A., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2001). Authentication of Nile perch (*Lates niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*), and wreck fish (*Polyprion americanus*) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene. **Journal of the AOAC International** 84, 777-781.

ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., RODRÍGUEZ, M.A., MAYORAL, B., LÓPEZ-CALLEJA, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2003). Identification of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*) and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets by polyclonal antibody-based ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 1169-1172.

ASHOOR, S.H., MONTE, W.C. y STILES, P.G. (1988). Liquid chromatographic identification of meats. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 71, 397-403.

ASLAM, M., HOGAN, J. y SMITH, L. (2003). Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in milk. **Food Microbiology** 20, 345-350.

AUDIBERT, F.M. y LISE, L.D. (1993). Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. **Immunology Today** 14, 281-284.

AVISE, J.C., ARNOLD, J., BALL, R.M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J.E., REEB, C.A. y SAUNDERS, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography, the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18, 489-522.

AYUSO, R., LEHRER, S.B., LOPEZ, M., REESE, G., IBÁÑEZ, M.D., ESTEBAN, M.M., OWNBY, D.R. y SCHWARTZ, H. (2000). Identification of bovine IgG as a major cross-reactive vertebrate meat allergen. **Allergy** 55, 348-354.

BANIA, J., UGORSKI, M., POLANOWSKI, A. y ADAMCZYK, E. (2001). Application of a Polymerase Chain Reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. **Journal of Dairy Research** 68, 333-336.

BARNES, K.W. (1995). An introduction to food analysis techniques. **Food Technology** 49, 47-50.

BARROSO, A., DUNNER, S. y CAÑÓN, J. (1998). Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). **Journal of Animal Science** 76, 1535-1538.

BARROSO, A., DUNNER, S. y CAÑÓN, J. (1999). Use of PCR-Single Strand Conformation Polymorphism analysis for detection of bovine beta-casein variants A1, A2, A3, and B. **Journal of Animal Science** 77, 2629-2632.

BARTLETT, S.E. y DAVIDSON, W.S. (1992). FINS (forensically informative sequencing): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens. **BioTechniques** 12, 408-411.

BATAILLE, M., CRAINIC, K., LETERREUX, M., DURIGON, M. y DE MAZANCOURT, P. (1999). Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. **Forensic Science International** 99, 165-170.

BAUER, F. y HOFMANN, K. (1989). Electrophoretic identification of animal species in heat treated meat and meat products. **Fleischwirtschaft** 69, 419-422.

BAUM, B.R. y BAILEY, G.L. (1997). The molecular diversity of the 5S rRNA gene in *Kengyilia alata* (Drobov) J.L Yang, Yen & Baun (*Poaceae, Triticeae*), potential genomic assignment of different rDNA units. **Genome** 40, 215-228.

BEDNARCZYK, M., SIWEK, M., MAZANOWSKI, A. y CZEKALSKI, P. (2002). DNA polymorphism in various goose lines by RAPD-PCR. **Folia Biologica (Kraków)** 50, 45-48.

BELKHIRI, A., INTENGAN, H. y KLASSEN, G.R. (1997). A tandem array of 5S ribosomal RNA genes in *Pythium irreulare*. **Gene** 186, 155-159.

BELLAGAMBA, F., MORETTI, V.M., COMINCINI, S. y VALFRÈ, F. (2001). Identification of species in animal feedstuffs by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of mitochondrial DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49, 3775-3781.

BELLAGAMBA, F., VALFRÈ, F., PANSERI, S. y MORETTI, V.M. (2003). Polymerase Chain Reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. **Journal of Food Protection** 66, 682-685.

BELLIS, C., ASHTON, K.J., FRENEY, L., BLAIR, B. y GRIFFITHS, L.R. (2003). A molecular genetic approach for forensic animal species identification. **Forensic Science International** 134, 99-108.

BERGER, R.G., MAGEAU, R.P., SCHWAB, B. y JOHNSTON, R.W. (1988). Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked, immunosorbent assays. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 71, 406-409.

BHAGWAT, A.A. (2004). Rapid detection of *Salmonella* from vegetable rinse-water using real-time PCR. **Food Microbiology** 21, 73-78.

BILLET, E.E., BEVAN, R., SCANLON, B., PICKERING, K. y GIBBONS, B. (1996). The use of a poultry-specific murine monoclonal antibody directed to the insoluble muscle protein desmin in meat speciation. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 70, 396-404.

BJORKLUND, E., PALLARONI, L., VON HOLST, C. y UNGLAUB, W. (2001). Method of determination of appropriate heat treatment of animal meal by immunoassay developed for detection of cooked beef: interlaboratory study. **Journal of AOAC International** 84, 1839-1845.

BLUM, J.C. (1997). Formation du *foie gras*: caractéristiques physiologiques et biochimiques. **Comptes Rendus de l'Académie de Agriculture de France** 83, 101-115.

BONNEAU, C. (1995). Le *foie gras* d'hier, d'aujourd'hui, de demain. **Viandes et Produits Carnés** 16, 97-100.

BONNEFOI, M., BENARD, G. y LABIE, C. (1986). Gel electrophoresis: A qualitative method for detection of duck and goose liver in canned *foie gras*. **Journal of Food Science** 51, 1362-1363.

BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E. y VAN DER NOORDAA, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology** 28, 495-503.

BORGO, R., SOULY-CROSSET, C., BOUCHON, D. y GOMOT, L. (1996). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. **Journal of Food Science** 61, 1-4.

BOTTERO, M.T., CIVERA, T., ANASTASIO, A., TURI, R.M. y ROSATI, S. (2002). Identification of cow's milk in "buffalo" cheese by duplex Polymerase Chain Reaction. **Journal of Food Protection** 65, 362-366.

BOTTERO, M.T., CIVERA, T., NUCERA, D., ROSATI, S., SACCHI, P. y TURI, R.M. (2003). A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. **International Dairy Journal** 13, 277-282.

BOWDITCH, B.M., ALBRIGHT, D.G., WILLIAMS, J.G. y BRAUN, M.J. (1993). Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. **Methods in Enzymology** 224, 294-309.

BOYAPALLE, S., WESLEY, I.V., HURD, H.S. y REDDY, P.G. (2001). Comparison of culture, multiplex, and 5' nuclease Polymerase Chain Reaction assays for the rapid detection of *Yersinia enterocolitica* in swine and pork products. **Journal of Food Protection** 64, 1352-1361.

BRANCIARI, R., NIJMAN, I.J., PLAS, M.E., DI ANTONIO, E. y LENSTRA, J.A. (2000a). Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese. **Journal of Food Protection** 63, 408-411.

BRANCIARI, R., AVELLINI, P., SUKASI-SANGAMAYYA, R., DI ANTONIO, E. y REA, S. (2000b). Analisi PCR-RFLP per la determinazione di specie in *prodotti carnei* trattati termicamente. **Industrie Alimentari** 39, 313-318.

BRODMANN, P.D., ILG, E.C., BERTHOUD, H. y HERMANN, A. (2002). Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. **Journal of AOAC International** 85, 646-653.

BRODMANN, P.D. y MOOR, D. (2003). Sensitive and semi-quantitative Taqman™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos Taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. **Meat Science** 65, 599-607.

BROWN, W.M., GEORGE, M. y WILSON, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 76, 1967-1971.

BUCHER, K., SZALAI, G., MARTI, E., GRIOT-WENK, M.E. y LAZARY, S. (1996). Tumour suppressor gene p53 in the horse: identification, cloning, sequencing and a possible role in the pathogenesis of equine sarcoid. **Research in Veterinary Science** 61, 114-119.

BURGENER, M. y HÜBNER, P. (1998). Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forchunf** 207, 261-263.

CALVO, J.H., ZARAGOZA, P. y OSTA, R. (2001a). A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. **Journal of Animal Science** 79, 2108-2112.

CALVO, J.H., ZARAGOZA, P. y OSTA, R. (2001b). Random Amplified Polymorphic DNA fingerprints for the identification of species in poultry pate. **Poultry Science** 80, 522-524.

CALVO, J.H., RODELLAR, C., ZARAGOZA, P. y OSTA, R. (2002a). Beef and bovine-derived material identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50, 5262-5264.

CALVO, J.H., OSTA, R. y ZARAGOZA, P. (2002b). Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and paté. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50, 5265-5267.

CAMACHO, M.A., TORRES, A.I., GIL-ALEGRE, M.E., OBREGÓN, M.M. y RUZ, V. (1993). Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. **STP Pharma Pratiques** 3, 197-202.

CANCALON, P.F. (1995a). Capillary electrophoresis: a useful technique for food analysis. **Food Technology** 49, 52-58.

CANCALON, P.F. (1995b). Capillary electrophoresis: a new tool in food analysis. **Journal of AOAC International** 78, 12-15.

CARRERA, E., MARTÍN, R., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1996). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of smoked salmon (*Salmo salar*), trout (*Oncorhynchus mykiss*) and bream (*Brama raii*). **Journal of Food Protection** 59, 521-524.

CARROLL, S.L., BERGSMA, D.J. y SCHWARTZ, R.J. (1986). Structure and complete nucleotide sequence of the chicken alpha-smooth muscle (aortic) actin

gene. An actin gene which produces multiple messenger RNAs. **Journal of Biological Chemistry** 261, 8965-8976.

CASTERA, A., COUSTILLE, J.L., MEHRING, F. y MORDRET, F. (1991). *Foies gras*: Composition de la fraction lipidique possibilité de détection d'ajouts de graisses provenant d'autres parties anatomiques du palmipede. **Annales des Falsifications de l'Expertise Chimique et Toxicologique** 84, 27-42.

CASTRO, C., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T., MARTÍN, R., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1990). Detección de carne de pollo en mezclas cárnicas frescas utilizando anticuerpos monoclonales y un ELISA indirecto. **Revista de Agroquímica y Tecnología de alimentos** 30, 461-468.

CÉSPEDES, A., GARCÍA, T., CARRERA, E., GONZÁLEZ, I., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1998). Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) and restriction analysis of the cytochrome b gene. **Journal of Food Science** 63, 206-209.

CÉSPEDES, A., GARCÍA, T., CARRERA, E., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999a). Indirect ELISA for the identification of sole (*Solea solea*), European plaice (*Pleuronectes platessa*), flounder (*Platichthys flesus*), and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). **Journal of Food Protection** 62, 1178-1182.

CÉSPEDES, A., GARCÍA, T., CARRERA, E., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (1999b). Identification of sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47, 1046-1050.

CHARLTON, K., HARRIS, W.J. y PORTER, A.J. (2001). The isolation of super-sensitive anti-hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep. **Biosensors & Bioelectronics** 16, 639-646.

CHEN, F-C., HSIEH, Y-H.P. y BRIDGMAN, R.C. (1998). Monoclonal antibodies to porcine thermal-stable muscle protein for detection of pork in raw and cooked meats. **Journal of Food Science** 63, 201-205.

CHEN, F.C. y HSIEH, Y.H. (2000). Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA. **Journal of AOAC International** 83, 79-85.

CHEN, F-C., HSIEH, Y-H.P. y BRIDGMAN, R.C. (2002). Monoclonal antibodies against troponin I for the detection of rendered muscle tissues in animal feedstuffs. **Meat Science** 62, 405-412.

CHIKUNI, K., TABATA, T., SAITO, M. y MONMA, M. (1994a). Sequencing of mitochondrial cytochrome b genes for the identification of meat species. **Animal Science and Technology** 65, 571-579.

CHIKUNI, K., TABATA, T., KOSUGIYAMA, M., MONMA, M. y SAITO, M. (1994b). Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. **Meat Science** 37, 337-345.

CHOI, Y.J., YIM, D.S., CHO, J.S., CHO, B.D., NA, K.J. y BAIK, M.G. (1997). Analysis of restriction fragment length polymorphism in the bovine growth hormone gene related to growth performance and carcass quality of Korean native cattle. **Meat Science** 45, 405-410.

CLARK, R.B. y ENGVALL, E. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Theoretical and practical aspects. En *Enzyme Immunoassays*. Magio, E.T. (Ed.), CRC Press, Cleveland, EE.UU., pp: 161-179.

CLOECKAERT, A. y SCHWARZ, S. (2001). Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica Typhimurium* DT104. **Veterinary Research** 32, 301-310.

COLGAN, S., O'BRIEN, L., MAHER, M., SHILTON, N., McDONNELL, K. y WARD, S. (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. **Food Research International** 34, 409-414.

COLOMBO, F., MARCHISIO, E., PIZZINI, A. y CANTONI, C. (2002a). Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a Polymerase Chain Reaction with an original primer pair. **Meat Science** 61, 291-294.

COLOMBO, F., MARCHISIO, E. y CANTONI, C. (2002b). Use of Polymerase Chain Reaction (PCR) and electrophoretic gel computer-assisted statistical analysis to semi-quantitatively determine pig/goose DNA ratio. **Italian Journal of Food Science** 14, 71-76.

COLOMBO, F., CARDIA, A., RENON, P. y CANTONI, C. (2004). A note on the identification of *Rupicapra rupicapra* species by polymerase chain reaction product sequencing. **Meat Science** 66, 753-755.

COMINCINI, S., SIRONI, M., BANDI, C., GIUNTA, C., RUBINI, M. y FONTANA, F. (1996). RAPD analysis of systematic relationships among the Cervidae. **Heredity** 76, 215-221.

CORDAL DE BOBBI, M.E., PETRACCA, A. y MORO, A.A. (1985). Preparation of reactants for the detection of proteins from different animal species by immunodiffusion. **Revista Argentina de Microbiología** 17, 209-216.

COTA-RIVAS, M., y VALLEJO-CÓRDOBA, B.V. (1997). Capillary electrophoresis for meat species differentiation. **Journal of Capillary Electrophoresis** 4, 195-199.

CUSHWA, W.T., DODDS, K.G., CRAWFORD, A.M., MEDRANO, J.F. (1996). Identification and genetic mapping of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers to the sheep genome. **Mammalian Genome** 7, 580-585.

CUTUFELLI, M.E., MAGEAU, R.P., SCHWAB, B. y JOHNSTON, R.W. (1993). Development of a multispecies identification field test by modified agar-gel immunodiffusion. **Journal of AOAC International** 76, 1022-1026.

DALMASSO, A., FONTANELLA, E., PIATTI, P., CIVERA, T., ROSATI, S. y BOTTERO, M.T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. **Molecular and Cellular Probes** (en prensa).

DALY, S.J., DILLON, P.P., BRENNAN, J., DUNNE, L., FITZPATRICK, J. y O'KENNEDY, R. (2001). Production and analytical applications of scFv antibody fragments. **Analytical Letters** 34, 1799-1827.

DAVEY, H.W., KELLY, J.K. y WILDEMAN, A.G. (1995). The nucleotide sequence, structure, and preliminary studies on the transcriptional regulation of the bovine alpha skeletal actin gene. **DNA and Cell Biology** 14, 609-618.

DÉCRET no 93-999 du 9 août 1993, relatif aux préparations à base de *foie gras*. **Journal Officiel de la République Française** (J.O.R.F.), numéro 187 du 14 Aout 1993.

DESALLE, R., WILLIAMS, A. y GEORGE, M. (1993). Isolation and characterization of animal mitochondrial DNA. **Methods in Enzymology** 224, 176-203.

DESHPANDE, S.S. (1996). *Enzyme Immunoassays from Concept to Product Development*. Chapman y Hall (Ed.), New York, EE.UU.

DESJARDIN, L.E., CHEN, Y., PERKINS, M.D., TEIXEIRA, L., CAVE, M.D. y EISENACH, K.D. (1998). Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology** 36, 1964-1968.

DESJARDINS, P., L'ABBE, D., LANG, B.F. y MORAIS, R. (1989). Putative chicken "muscle specific 7 S RNA" is related to the mitochondrial ATPase 6 gene. **Journal of Molecular Biology** 207, 625-629.

DESJARDINS, P. y MORAIS, R. (1990). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. **Journal of Molecular Biology** 212, 599-634.

DIDENKO, V.V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): Designs and applications. **BioTechniques** 31, 1106-1121.

DUNBAR, B.S. y SCHWOEBEL, E.D. (1990). Preparation of polyclonal antibodies. **Methods in Enzymology** 182, 663-670.

EBASHI, S. y ENDO, M. (1968). Calcium ion and muscle contraction. **Progress in Biophysical and Molecular Biology** 18, 123-183.

EL MOUEFFAK, A., CRUZ, C., ANTOINE, M., MONTURY, M., DEMAZEAU, G., LARGETEAU, A., ROY, B. y ZUBER, F. (1995). High pressure and pasteurization effect on duck *foie gras*. **International Journal of Food Science and Technology** 30, 737-743.

ELEDATH, F.M. y HINES, H.C. (1996). Detection of nucleotide variations in the D-loop region of bovine mitochondrial DNA using Polymerase Chain Reaction-based methodologies. **Animal Genetics** 27, 333-336.

ESPINOZA, E.O., KIRMS, M.A. y FILIPEK, M.S. (1996). Identification and quantification of source from hemoglobin of blood and blood mixtures by high performance liquid chromatography. **Journal of Forensic Sciences** 41, 804-811.

FAIRBROTHER, K.S., HOPWOOD, A.J., LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (1998a). Meat speciation by restriction fragment length polymorphism analysis using an α -actin cDNA probe. **Meat Science** 50, 105-114.

FAIRBROTHER, K.S., HOPWOOD, A.J., LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (1998b). The actin multigene family and livestock speciation using the polymerase chain reaction. **Animal Biotechnology** 9, 89-100.

FELIGINI, M. y PARMA, P. (2003). The complete nucleotide sequence of goat (*Capra hircus*) mitochondrial genome. **DNA sequence** 14, 199-203.

FELSENSTEIN, J. (1993). *PHYLIP* (Phylogeny Inference Package). Versión 3.5c. Programa distribuido por el autor. University of Washington, Seattle, WA.

FERGUSON, A., TAGGART, J.B., PRODÖHL, P.A., McMEEL, O., THOMPSON, C., STONE, C., MCGINNITY, P. y HYNES, R.A. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. **Journal of Fish Biology** 47, 103-126.

FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, T., ASENSIO, L., RODRÍGUEZ, M.A., GONZÁLEZ, I., LOBO, E., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2002). Identification of the clam species *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell), *Venerupis romboides* (yellow carpet shell) and *Venerupis pullastra* (pullet carpet shell) by ELISA. **Food and Agricultural Immunology** 14, 65-71.

FILION, M., St-ARNAUD, M. y JABARI-HARE, S.H. (2003). Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods** 53, 67-76.

FORNWALD, J.A., KUNCIO, G., PENG, I. y ORDAHL, P. (1982). The complete nucleotide sequence of the chick α -actin gene and its evolutionary relationship to the actin gene family. **Nucleic Acids Research** 10, 3861-3876.

FORREST, A.R.R. y CARNEGIE, P.R. (1994). Identification of gourmet using FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing). **BioTechniques** 17, 24-26.

FREDERICK, R.D., SNYDER, C.L., PETERSON, G.L. y BONDE, M.R. (2002). Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. Meibomia*. **Phytopathology** 92, 217-227.

FREZZA, D., FAVARO, M., VACCARI, G., VON-HOLST, C., GIAMBRA, V., ANKLAM, E., BOVE, D., BATTAGLIA, P.A., AGRIMI, U., BRAMBILLA, G., AJMONE-MARSAN, P. y TARTAGLIA, M. (2003). A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. **Journal of Food Protection** 66, 103-109.

FUJITA, K. y SILVER, J. (1994). Single-strand conformational polymorphism. **PCR Methods and Applications** 4, 137-139.

GARCÍA, T., MARTÍN, R., MORALES, P., HAZA, A.I., ANGUITA, G., GONZÁLEZ, I., SANZ, B. y HERNÁNDEZ, P.E. (1994). Production of a horse specific monoclonal antibody and detection of horse meat in raw meat mixtures by an indirect ELISA. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 66, 411-415.

GAVILONDO, J.V. y LARRICK, J.W. (2000). Antibody engineering at the millennium. **BioTechniques** 29, 128-145.

GIRISH, P.S., ANJANEYULU, A.S.R., VISWAS, K.N., ANAND, M., RAJKUMAR, N., SHIVAKUMAR, B.M. y BHASKAR, S. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. **Meat Science** 66, 551-556.

GLAVAC, D. y DEAN, M. (1993). Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. **Human Mutation** 2, 404-414.

GRUBER, F., FALKNER, F.G., DORNER, F. y HÄMMERLE, T. (2001). Quantitation of viral DNA by real-time PCR applying duplex amplification, internal standardization, and two-color fluorescence detection. **Applied and Environmental Microbiology** 67, 2837-2839.

GUOLI, Z., MINGGUANG, Z., ZHIJIANG, Z., HONGSHENG, O. y QIANG, L. (1999). Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. **Meat Science** 51, 233-236.

GUY, G., BAEZA, E., SALICHON, M.R., JUIN, H. y ROUSSELOT-PAILLEY, D. (1998). Influence des conditions d'élevage de l'oie sur la production de *foie gras* et de viande. **Annales de Zootechnie** 47, 215-224.

HAJMEER, M., CLIVER, D.O. y PROVOST, R. (2003). Spinal cord tissue detection in comminuted beef: comparison of two immunological methods. **Meat Science** 65, 757-763.

HARLOW, E. y LANE, D. (1999). *Using Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Ed.), New York, EE.UU.

HASLBERGER, A.G. (2000). Monitoring and labeling for genetically modified products. **Science** 287, 431-432.

HEMMEN, F., PARAF, A. y SMITH-GILL, S. (1993). Lysozymes in eggs and plasma from chicken, duck and goose: choice and use of mAbs to detect adulterants in "*foie gras*". **Journal of Food Science** 58, 1291-1293.

HENEGARIU, O., HEEREMA, N.A., DLOUHY, S.R., VANCE, G.H. y VOGT, P.H. (1997). Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. **BioTechniques** 23, 504-511.

HERMAN, L. (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. **Journal of Dairy Research** 68, 429-436.

HERMIER, D. (1997). La stéatosis hépatique de l'oie. **Cahiers de Nutrition et de Diététique** 32, 242-246.

HERNÁNDEZ, M., ESTEVE, T., PRAT, S. y PLA, M. (2004). Development of real-time PCR systems based on SYBR® Green I, Amplifluor™ and TaqMan®

technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. **Journal of Cereal Science** 39, 99-107.

HIENDLEDER, S., LEWALSKI, H., WASSMUTH, R. y JANKE, A. (1998). The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. **Journal of Molecular Evolution** 47, 441-448.

HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P.S. y GRIFFITH, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology** 10, 413-417.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G. y WATSON, R. (1993). Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology** 11, 1026-1030.

HIRD, H., GOODIER, R. y HILL, M. (2003). Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualisation with *vistra green*. **Meat Science** 65, 1117-1123.

HOFMANN, K. (1987). Fundamental problems in identifying the animal species of muscle meat using electrophoretic methods. **Fleischwirtschaft** 67, 820-826.

HOOGENBOOM, H.R., DE BRUÏNE, A.P., HUFTON, S.E., HOET, R.M., ARENDS, J-W. y ROOVERS, R.C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. **Immunotechnology** 4, 1-20.

HOOGENBOOM, H.R. (2002). Overview of antibody phage display technology and its applications. En: O'Brien, P.M., Aitken, R. (Eds.), *Antibody Phage Display: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, 1-37.

HOPWOOD, A.J., FAIRBROTHER, K.S., LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (1999). An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. **Meat Science** 53, 227-231.

HSIEH, H-M., CHIANG, H-L., TSAI, L-C., LAI, S-Y., HUANG, N-E., LINACRE, A. y LEE, J.C-I. (2001). Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. **Forensic Science International** 122, 7-18.

HSIEH, Y-H.P., WOODWARD, B.B. y HO, S.H. (1995). Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays. **Journal of Food Protection** 58, 555-559.

HSIEH, Y-H.P., SHEU, S-C. y BRIDGMAN, R.C. (1998). Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats. **Journal of Food Protection** 61, 476-481.

HU, M.C.T., SHARP, S.B. y DAVISON, N. (1986). The complete sequence of the mouse skeletal alpha-actin gene reveals several conserved and inverted repeat sequences outside of the protein-coding region. **Molecular and Cellular Biology** 6, 15-25.

HUI, G.S. (1994). Liposomes, muramyl dipeptide derivatives, and nontoxic lipid A derivatives as adjuvants for human malaria vaccines. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 50, 41-51.

JONES, C.J., EDWARDS, K.J., CASTAGLIONE, S., WINFIELD, M.O., SALA, F., VAN DE WIEL, C., BREDEMEIJER, G., VOSMAN, B., MATTHES, M., DALY, A., BRETTSCHEIDER, R., BETTINI, P., BUIATTI, M., MAESTRI, E., MALCEVSCHI, A., MARMIROLI, N., AERT, R., VOLCKAERT, G., RUEDA, J., LINACERO, R., VÁZQUEZ, A. y KARP, A. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding** 3, 381-390.

JONES, S.J. y PATTERSON, R.L.S. (1986). A modified indirect ELISA procedure for raw meat speciation using crude anti-species antisera and stabilized immunoreagents. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 37, 767-775.

JOTHIKUMAR, N., WANG, X. y GRIFFITHS, M.W. (2003). Real-time SYBR Green I-Based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection** 66, 2141-2145.

KANGETHE, E.K., JONES, S.J. y PATTERSON, R.L. (1982). Identification of the species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. **Meat Science** 7, 229-240.

KANGETHE, E.K., GATHUMA, J.M. y LINDQVIST, K.J. (1986). Identification of the species of origin of fresh, cooked and canned meat and meat products using antisera to thermostable muscle antigens by Ouchterlony's double diffusion test. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 37,157-164.

KARU, A.E., SCHOLTHOF, K., ZHANG, G. y BELL, W. (1994). Recombinant antibodies to small analytes and prospects for deriving them from synthetic combinatorial libraries. **Food and Agricultural Immunology** 6, 277-286.

KIMURA, B., KAWASAKI, S., NAKANO, H. y FUJII, T. (2001). Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmosphere-packaged fish. **Applied and Environmental Microbiology** 67, 206-216.

KINGOMBE, C.I.B., LÜTHI, E., SCHLOSSER, H., HOWALD, D., KUHN, M. y JEMMI, T. (2001). A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions of animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy. **Meat Science** 57, 35-41.

KOCHER, T.D., THOMAS, W.K., MEYER, A., EDWARDS, S.V., PÄÄBO, S., VILLABLANCA, F.X. y WILSON, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 86, 6196-6200.

KOH, M.C., LIM, C.H., CHUA, S.B., CHEW, S.T. y PHANG, S.T.W. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. **Meat Science** 48, 275-285.

KÖLLERMANN, J., MÜLLER, M., GOESSL, C., KRAUSE, H., HELPAP, B., PANTEL, K. y MILLER, K. (2003). Methylation specific PCR for DNA-based detection of occult tumor cells in lymph nodes of prostate cancer patients. **European Urology** 44, 533-538.

KOMIYA, H. y TAKEMURA, S. (1979). Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. **Journal of Biochemistry** 86, 1067-1080.

KRCMAR, P. y RENCOVA, E. (2001). Identification of bovine-specific DNA in feedstuffs. **Journal of Food Protection** 64, 117-119.

KRCMAR, P. y RENCOVA, E. (2003). Identification of species-specific DNA in feedstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 7655-7658.

KRUMBHOLZ, A., WURM, R., SCHECK, O., BIRCH-HIRSCHFELD, E., EGERER, R., HENKE, A., WUTZLER, P. y ZELL, R. (2003). Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR. **Journal of Virological Methods** 113, 51-63.

KWOK, S., CHANG, S.Y., SNINDKY, J.J. y WANG, A. (1994). A guide design and use of mismatched and degenerate primers. **PCR Methods and Applications** 3, 39-47.

LABIE, C. y TOURNUT, B. (1970). Recherches sur les modifications histologiques et biochimiques chez les oies soumises au gavage. **Cahiers de Médecine Vétérinaire** 39, 247-261.

LAHIFF, S., GLENNON, M., O'BRIEN, L., LYNG, J., SMITH, T., MAHER, M. y SHILTON, N. (2001). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). **Molecular and Cellular Probes** 15, 27-35.

LAHIFF, S., GLENNON, M., LYNG, J., SMITH, T., SHILTON, N. y MAHER, M. (2002). Real time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. **Journal of Food Protection** 65, 1158-1165.

LAURENT, P. y RODELLAR, C. (2001). Characterization of a single nucleotide polymorphism in the coding sequence of the bovine transferrin gene. **Mutation Research Genomics** 458, 1-5.

LE BA, D. y ZUBER, F. (1996). La pasteurisation des *foies gras*. **Viandes et Produits Carnés** 17, 151-156.

LEADER, D.P., GALL, I., CAMPBELL, P. y FRISCHAUF, A.M. (1986). Isolation and characterization of cDNA clones from mouse skeletal muscle actin mRNA. **DNA** 5, 235-238.

LEE, J.C. y CHANG, J.G. (1994). Random amplified polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) fingerprints in forensic species identification. **Forensic Science International** 67, 103-107.

LEE, Y.J., CHEN, Y.P., WANG, S.H., CHOW, W.Y. y LIN, L.Y. (1996). Structure and expression of metallothionein gene in ducks. **Gene** 176, 85-92.

LEE, W.J. y MORGAN, M.R.A. (1993). Food immunoassays: applications of polyclonal, monoclonal and recombinant antibodies. **Trends in Food Science and Technology** 4, 129-133.

LEPRETTRE, S., AUVERGNE, A., MANSE, H., BABILÉ, R., DUBOIS, J.P. y CANDAU, M. (1998). Incidence de la durée du jeûne sur la composition biochimique des *foies gras* d'oies et leur rendement á la stérilisation. **Sciences des Aliments** 18, 415-422.

LIN, C.S., SUN, Y.L., LIU, C.Y., YANG, P.C., CHANG, L.C., CHENG, I.C., MAO, S.J. y HUANG, M.C. (1999). Complete nucleotide sequence of pig (*Sus scrofa*) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence within Artiodactyla. **Gene** 236, 107-114.

LITTLE, M., FUCHS, P., BREITLING, F. y DÜBEL, S. (1993). Bacterial surface presentation of proteins and peptides: an alternative to phage technology? **Trends in Biotechnology** 11, 3-5.

LITTLE, R.D. y BRAATEN, D.C (1989). Genomic organization of human 5S rRNA and sequence of one tandem repeat. **Genomics** 59, 1267-1270.

LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (2000). DNA-based methods for food authentication. **Trends in Food Science and Technology** 11, 67-77.

LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (2002). Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. **Meat Science** 61, 163-168.

MACEDO-SILVA, A., BARBOSA, S.F.C., ALKMIN, M.G.A., VAZ, A.J., SHIMOKOMAKI, M. y TENUTA-FILHO, A. (2000). Hamburger meat identification by dot-ELISA. **Meat Science** 56, 189-192.

MACKIE, I.M., PRYDE, S.E., GONZALES-SOTELO, C., MEDINA, I., PÉREZ-MARTÍN, R., QUINTEIRO, J., REY-MENDEZ, M. y REHBEIN, H. (1999). Challenges in the identification of species of canned fish. **Trends in Food Science and Technology** 10, 9-14.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. y SAMBROOK, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Ed.), New York, EE.UU.

MARKLUND, S., CHAUDHARY, R., MARKLUND, L., SANDBERG, K. y ANDERSSON, L. (1995). Extensive mtDNA diversity in horses revealed by PCR-SSCP analysis. **Animal Genetics** 26, 193-196.

MARRAS, S.A., KRAMER, F.R. y TYAGI, S. (1999). Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons. **Genetic Analysis** 14, 151-156.

MARTIN, D.R., CHAN, J. y CHIU, J.Y. (1998). Quantitative evaluation of pork adulteration in raw ground beef by radial immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Food Protection** 61, 1686-1690.

MARTÍN, R., AZCONA, J.I., GARCÍA, T., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1988a). Sandwich ELISA for detection of horse meat in raw meat mixtures using antisera to muscle soluble proteins. **Meat Science** 22, 143-153.

MARTÍN, R., AZCONA, J.I., TORMO, J., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1988b). Detection of chicken meat in raw meat mixtures by a sandwich enzyme immunoassay. **International Journal of Food Science and Technology** 23, 303-310.

MARTÍN, R., AZCONA, J.I., CASAS, C., HERNÁNDEZ, P.E. y SANZ, B. (1988c). Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins. **Journal of Food Protection** 51, 790-794.

MARTÍNEZ, I. y MALMHEDEN YMAN, I. (1998). Species identification in meat products by RAPD analysis. **Food Research International** 31, 459-466.

MARTÍNEZ, I. y DANÍELSDÓTTIR, A.K. (2000). Identification of marine mammal species in food products. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 80, 527-533.

MARTÍNEZ, J.M., MARTÍNEZ, M.I., SUÁREZ, A., HERRANZ, C., CINTAS, L.M., RODRÍGUEZ, J.M. y HERNÁNDEZ, P.E. (1998). Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. **Applied and Environmental Microbiology** 64, 4536-4545.

MATSUNAGA, T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., SHIBATA, K., YAMADA, J. y SHIMURA, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. **Meat Science** 51, 143-148.

MAUDET, C. y TABERLET, P. (2001). Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. **Journal of Dairy Research** 68, 229-235.

McCORMICK, R.J., REECK, G.R. y KROPF, D.H. (1988). Separation and identification of porcine sarcoplasmic proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 36, 1193-1196.

McLEAN, M., GERATS, G.M., BAIRD, W.V y MEAGHER, R.B. (1990). Six actin gene subfamilies map to five chromosomes of *Petunia hybrida*. **Journal of Heredity** 81, 341-346.

McPHERSON, J.D., MARRA, M., HILLIER, L., WATERSON, R.H. y CHINWALLA, A. (2001). A physical map of the human genome. **Nature** 409, 934-941.

MEYER, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En: *Biochemistry and molecular biology in fishes*. Hochachka and Mommsen (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 1-38.

MEYER, R., CANDRIAN, U. y LÜTHY, J. (1994). Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International** 77, 617-622.

MEYER, R., HÖFELEN, C., LÜTHY, J. y CANDRIAN, U. (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. **Journal of AOAC International** 78, 1542-1551.

MEYER, R. y CANDRIAN, U. (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** 29, 1-9.

MINDELL, D.P., KNIGHT, A., BAER, C. y HUDDLESTON, C.J. (1996). Slow rates of molecular evolution in birds and the metabolic rate and body temperature hypotheses. **Molecular Biology and Evolution** 13, 422-426.

MINDELL, D.P., SORENSON, M.D., HUDDLESTON, C.J., MIRANDA, H.C., KNIGHT, A., SAWCHUK, S.J. y YURI, T. (1997). Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA. En: *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Mindell, D.F. (Ed.), 211-245.

MONTIEL-SOSA, J.F., RUIZ-PESINI, E., MONTOYA, J., RONCALÉS, P., LÓPEZ-PÉREZ, M.J. y PÉREZ-MARTOS, A. (2000). Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 18, 2829-2832.

MORITZ, C., DOWLING, T.E. y BROWN, W.M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA, relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18, 269-292.

MOUNIER, N., GOUY, M., MOUCHIROUD, D. y PRUDHOMME, J.C. (1992). Insect muscle actins differ distinctly from invertebrate and vertebrate cytoplasmic actins. **Journal of Molecular Evolution** 34, 406-415.

MURAKAMI, M. y FUJITANI, H. (1998). Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). **Genes and Genetics Systems** 73, 9-20.

MYERS, M.J., YANCY, H.F. y FARRELL, D.E. (2003). Characterization of a Polymerase Chain Reaction-Based Approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed. **Journal of Food Protection** 66, 1085-1089.

NAKAJIMA, E., MATSUMOTO, T., YAMADA, R., KAWAKAMI, K., TAKEDA, K., OHNISHI, A. y KOMATSU, M. (1996). Use of a PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) for detection of a point mutation in the swine Ryanodine receptor (*RYR1*) gene. **Journal of Animal Science** 74, 2904-2906.

NICOLAS, L., PRINA, E., LANG, T. y MILON, G. (2002). Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology** 40, 1666-1669.

NOTI, J.D. y REINEMANN, B.C. (1996). DNA fingerprinting of mammalian cell lines using nonradioactive arbitrarily primed PCR (AP-PCR). **BioTechniques** 20, 178-180.

OOHARA, I. (1997). Detection of single strand conformation polymorphisms (SSCPs) on mitochondrial DNA fragments between two domesticated strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science** 63, 151-152.

ORDEN de la Presidencia del Gobierno de 5 de noviembre de 1981 por la que se aprueba la norma genérica de calidad para productos cárnicos tratados por calor. **Boletín Oficial del Estado** número 268, de 9 de noviembre de 1981.

ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K. y SEKIYA, T. (1989a). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 86, 2766-2770.

ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T. y HAYASHI, K. (1989b). A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. **Genomics** 5, 874-879.

OZGEN ARUN, O. y UGUR, M. (2000). Animal species determination in sausages using an SDS-PAGE technique. **Archiv für Lebensmittelhygiene** 51, 49-53.

PALMER, B.R., SU, H.Y., ROBERTS, N., HICKFORD, J.G. y BICKERSTAFFE, R. (2000). Single nucleotide polymorphisms in an intron of the ovine calpastatin gene. **Animal Biotechnology** 11, 63-67.

PAN, Y.F., LEE, Y.H.W., WEI, Y.H. y CHIANG, A.N. (1993). A gene cytochrome C oxidase subunit II in duck mitochondrial DNA: structural features and sequence evolution. **Biochemistry International** 30, 479-489.

PANDEY, A. y MANN, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. **Nature** 405, 837-846.

PAREJO, J.C., PADILLA, J.A., RABASCO, A., SANSINFORIANO, M. y MARTÍNEZ-TRANCÓN, M. (2002). Population structure in the endangered Blanca Cacereña bovine breed demonstrated by RAPD analyses. **Genes and Genetic Systems** 77, 51-58.

PARTIS, L., CROAN, D., GUO, Z., CLARK, R., COLDHAM, T. y MURBY, J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meat. **Meat Science** 54, 369-376.

PATTERSON, R.L. y JONES, S.J. (1990). Review of current techniques for the verification of the species origin of meat. **Analyst** 115, 501-506.

PÉ, M.P. (1997). Le marché du *foie gras*. **Comptes Rendus de l'Académie de Agriculture de France** 83, 127-137.

PELLICIA, F., BARZOTTI, R., VOLPI, E.V., BUCCIARELLI, E. y ROCCHI, A. (1998). Nucleotide sequence and chromosomal mapping of the 5S rDNA repeat of the crustacean *Proasellus coxalis*. **Genome** 41, 129-133.

PENDÁS, A.M., MORAN, P., FREIJE, J.P. y GARCÍA-VÁZQUEZ, E. (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon by brown trout hybrid identification. **Cytogenetics and Cell Genetics** 67, 31-36.

PENDÁS, A.M., MORAN, P., MARTÍNEZ, J.L. y GARCÍA-VÁZQUEZ, E. (1995). Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout and in Atlantic salmon by brown trout hybrid identification. **Molecular Ecology** 4, 275-276.

PERNA, N.T. y KOCHER, T.D. (1996). Mitochondrial DNA: molecular fossils in the nucleus. **Current Biology** 6, 128-129.

PICKERING, K., GRIFFIN, M., SMETHURST, P., HARGIN, K.D. y STEWART, C.A. (1995). Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products – IV: Immunology. **Meat Science** 40, 327-336.

POLLARD, T.D. y COOPER, J.A. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. **Annual Review of Biochemistry** 55, 987-1035.

PUERTAS, M.J. (1992). Métodos de estudio del DNA. En *Genética: Fundamentos y Perspectivas*. Ed. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España, 315-345.

QUINN, J.S., GUGLICH, E., SEUTIN, G., LAU, R., MARSOLAIS, J., PARNA, L., BOAG, P.T. y WHITE, B.N. (1992). Characterization and assessment of an avian repetitive DNA sequence as an icterid phylogenetic marker. **Genome** 35, 155-162.

QUINN, T.W. y WILSON, A.C. (1993). Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. **Journal of Molecular Evolution** 37, 417-425.

RAJAPAKSHA, W.R.A.K.J., THILAKARATNE, I.D.S.I.P., CHANDRASIRI, A.D.N. y NIROSHAN, T.D. (2002). Development of PCR assay for differentiation of some important wild animal meat of Sri Lanka. **Journal of Veterinary Medicine. Series B** 49, 322-324.

RAMIREZ, V., SAVOIE, P. y MORAIS, R. (1993). Molecular characterization and evolution of a duck mitochondrial genome. **Journal of Molecular Evolution** 37, 296-310.

REA, S., CHIKUNI, K. y AVELLINI, P. (1996). Possibility of using single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis for discriminating European pig and wild boar meat samples. **Italian Journal of Food Science** 3, 211-220.

REDDY, P.M. y MANDOKHOT, U.V. (2002). Studies on the identification of species origin of meats using immunochemical and biochemical techniques. **Journal of Food Science and Technology** 39, 234-239.

REECY, J.M., BIDWELL, C.A., BRILEY, G.P. y GRANT, A.L. (1996). Structure and regulation of the porcine skeletal α -actin encoding gene. **Gene** 180, 23-28.

REGLAMENTO 1321/2002/CE de la Comisión, de 22 de julio de 2002, que modifica el Reglamento 1538/1991/CE que establece las disposiciones de aplicación del Reglamento 1906/90/CE del Consejo, por el que se establecen normas de comercialización aplicables a las aves de corral. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L194, de 23 de julio de 2002.

REGLAMENTO 1538/1991/CE de la Comisión, de 5 de junio de 1991, que establece las disposiciones de aplicación del Reglamento 1906/90/CE del Consejo, por el que se establecen normas de comercialización aplicables a las aves de

corral. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L143, de 7 de junio de 1991.

REHBEIN, H. y HORSTKOTTE, B. (2003). Determination of the composition of multi-species fishery products by PCR-based techniques. First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference. 33rd WEFTA and 48th AFTC meetings, 11-14 June. Reykjavik-Iceland, L37, 190-192.

RENON, P., BERNARDI, C., SCOCCA, S., CANTONI, C. y GRIDAVILLA, G. (2003). IEF (Isoelectricfocusing) and gaschromatography to identify wild ruminant species. **Industrie Alimentari** 42, 496-500.

RESTANI, P., BERETTA, B., FIOCCHI, A., BALLABIO, C. y GALLI, C.L. (2002). Cross-reactivity between mammalian proteins. **Annals of Allergy, Asthma, and Immunology** 89, 11-15.

RINCÓN, G., D'ANGELO, M., GAGLIARDI, R., KELLY, L., LLAMBI, S. y POSTIGLIONI, A. (2000). Genomic polymorphism in Uruguayan Creole cattle using RAPD and microsatellite markers. **Research in Veterinary Science** 69, 171-174.

RITTENBURG, J.H. (1990). Fundamentals of immunoassay. En: *Development and Application of Immunoassays for Food Analysis*. Rittenburg, J.H. (Ed.), Elsevier Applied Science, London-New York, 29-57.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., FERNÁNDEZ, A., LOBO, E., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2001). Identification of goose (*Anser anser*) and mule duck (*Anas platyrhynchos x Cairina moschata*) foie gras by Multiplex Polymerase Chain Reaction Amplification of the 5S rDNA gene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49, 2717-2721.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., MAYORAL, B., LÓPEZ-CALLEJA, I., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2003a). Identification of goose, mule duck, chicken, turkey and pork in foie gras by species-specific PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 1524-1529.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., MAYORAL, B., LÓPEZ-CALLEJA, I., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2003b). Development of a

polymerase chain reaction assay for species identification of goose and mule duck in *foie gras* products. **Meat Science** 65, 1257-1263.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2003c). Qualitative PCR for the detection of chicken and pork in goose and mule duck *foie gras*. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 83, 1176-1181.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2004a). PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures. **Journal of Food Protection** 67, 172-177.

RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2004b). Quantitation of mule duck in goose *foie gras* using TaqMan real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** (en prensa).

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., HERNÁNDEZ, M., ESTEVE, T., HOORFAR, J. y PLA, M. (2003). A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. **Journal of Microbiological Methods** 54, 381-390.

ROLLAND, M.P., BITRI, L. y BESAÇON, P. (1993). Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine α -casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. **Journal of Dairy Research** 60, 413-420.

RONDOT, S., KOCH, J., BREITLING, F. y DÜBEL, S. (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. **Nature Biotechnology** 19, 75-78.

ROUSSELOT-PAILLEY, D. (1997). Évolution des techniques de production du *foie gras*. **Comptes Rendus de l'Académie de Agriculture de France** 83, 117-125.

ROUSSET, S., BAYLE, M.C., MARTIN, J.F. y TOURAILLE, C. (1993). Études des caractéristiques sensorielles d'apparence, de texture et d'arômes des *foies gras* d'oie et de canard. **Viandes et Produits Carnés** 14, 103-108.

ROUSSET, S., BAYLE, M.C., MARTIN, J.F. y TOURAILLE, C. (1994). Comment distinguer par évaluation sensorielle les *foies gras* d'oie et de canard? Etude préliminaire. **Sciences des Aliments** 14, 777-784.

RUBIN, G.M., YANDELL, M.D., WORTMAN, J.R., MIKLOS, G.L.G. y NELSON, C.R. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. **Science** 287, 2204-2215.

SAAVEDRA, C., REYERO, M. y ZOUROS, E. (1997). Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Genetics** 145, 1073-1082.

SAEZ, R., SANZ, Y. y TOLDRÁ, F. (2004). PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. **Meat Science** 66, 659-665.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. y ERLICH, H.A. (1988). Primed-direct enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science** 239, 487-491.

SAIKI, R.K. (1989). The design and optimisation of the polymerase chain reaction. En: *PCR Technology*. Erlich, H.A. (Ed.), Stockton Press, New York, EE.UU., 7-22.

SALICHON, M.R., GUY, G., ROUSSELOT, D. y BLUM, J.C. (1994). Composition des 3 types de foie gras: oie, canard mulard et canard de Barbarie. **Annales de Zootechnie** 43, 213-220.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Ed.), New York, EE.UU.

SANTÍN, C. y CENTRICH, F. (1997). Identificación de especie animal en productos cárnicos por electroforesis. **Alimentaria** 282, 43-48.

SAVAGE, A.W.J., RICHARDSON, R.I., JOLLEY, P.D., HARGIN, K.D. y STEWART C.A. (1995). Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - II: Gel Electrophoresis. **Meat Science** 40, 303-317.

SAWYER, J., WOOD, C., SHANAHAN, D., GOUT, S. y McDOWELL, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. **Food Control** 14, 579-583.

SCARLE, M.S. y EMBREY, K.E. (1990). Sequence-specific interactions of Hoescht 33258 with the minor groove of an adenine-tract DNA duplex studied in solution by ¹H NMR spectroscopy. **Nucleic Acids Research** 18, 3753-3762.

SCHULTZ, R.A., SWOAP, S.J., McDANIEL, L.D., ZHANG, B., KOON, E.C., GARRY, D.J., LI, K. y SANDERS WILLIAMS, R. (1998). Differential expression of mitochondrial DNA replication factors in mammalian tissues. **Journal of Biological Chemistry** 273, 3447-3451.

SCHWARTZ, R.J. y ROTHBLUM, K. (1980). Regulation of muscle differentiation: isolation and purification of chick actin messenger ribonucleic acid and quantitation with complementary deoxyribonucleic acid probes. **Biochemistry** 19, 2506-2514.

SCOBIE, A.E. y MACKIE, I.M. (1988). The use of sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis in fish species identification – A procedure suitable for cooked and raw fish. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 44, 343-351.

SEYBOLDT, C., JOHN, A., VON MUEFFLING, T., NOWAK, B. y WENZEL, S. (2003). Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction assay for species-specific detection of bovine central nervous system tissue in meat and meat products. **Journal of Food Protection** 66, 644-651.

SHARMA, D., APPARAO, K.B., SINGH, R.V. y TOTTEY, S.M. (2001). Genetic diversity among chicken breeds estimated through randomly amplified polymorphic DNA. **Animal Biotechnology** 12, 111-120.

SHEU, S-C. y HSIEH, Y-H.P. (1998). Production and partial characterization of monoclonal antibodies specific to cooked poultry meat. **Meat Science** 50, 315-326.

SHINDO, Y., KURIBARA, H., MATSUOKA, T., FUTO, S., SAWADA, C., SHONO, J., AKIYAMA, H., GODA, Y., TOYODA, M. e HINO, A. (2002). Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules. **Journal of AOAC International** 85, 1119-1126.

SKARPEID, H.J., KVAAL, K. y HILDRUM, K.I. (1998). Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing protein profiles. **Electrophoresis** 19, 3103-3109.

SLACK, K.E., JANKE, A., PENNY, D. y ARNASON, U. (2003). Two new avian mitochondrial genomes (penguin and goose) and a summary of bird and reptile mitogenomic features. **Gene** 302, 43-52.

SLADE, R.W., MORITZ, C., HEIDEMAN, A. y HALE, P.T. (1993). Rapid assessment of single copy nuclear DNA variation in diverse species. **Molecular Ecology** 2, 359-373.

SLATER, G.W., MAYER, P. y DROUIN, G. (1996). Migration of DNA through gels. **Methods in Enzymology** 270, 272-295.

SLATTERY, W.J. y SINCLAIR, A.J. (1983). Differentiation of meat according to species by the electrophoretic separation of muscle lactate dehydrogenase and esterase isoenzymes and isoelectric focusing of soluble muscle proteins. **Australian Veterinary Journal** 60, 47-51.

SMITH, D.M. (1995). Immunoassays in process control and speciation of meats. **Food Technology** 49, 116-119.

SMITH, E.J., JONES, C.P., BARTLETT, J. y NESTOR, K.E. (1996). Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys. **Poultry Science** 75, 579-584.

SOTELO, C.G., CHAPELA, M.J., REY, M. y PÉREZ-MARTÍN, R.I. (2003). Development of an identification and quantitation system for cod (*Gadus morhua*) using Taqman assay. First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference. 33rd WEFTA and 48th AFTC meetings, 11-14 June. Reykjavik-Iceland, L39, 195-198.

SPRINGER, M.S. y DOUZERY, E. (1996). Secondary structure and patterns of evolution among mammalian mitochondrial 12S rRNA molecules. **Journal of Molecular Evolution** 43, 357-373.

STEPNIAK, E., ZAGALSKA, M.M. y SWITONSKI, M. (2002). Use of RAPD technique in evolution studies of four species in the family Canidae. **Journal of Applied Genetics** 43, 489-499.

SUN, Y-L. y LIN, C-S. (2003). Establishment and application of a fluorescent Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-

RFLP) method for identifying porcine, caprine, and bovine meats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 1771-1776.

SWOFFORD, D.L. (1993). *PAUP: phylogenetic analysis using parsimony*. Versión 3.1. Programa distribuido por Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois, EE.UU.

TAJIMA, F. y NEI, M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. **Molecular Biology and Evolution** 1, 269-285.

TAKEDA, K., ONISHI, A., ISHIDA, N., KAWAKAMI, K., KOMATSU, M. y INUMARU, S. (1995). SSCP analysis of pig mitochondrial DNA D-loop region polymorphism. **Animal Genetics** 26, 321-326.

TARTAGLIA, M., SAULLE, E., PESTALOZZA, S., MORELLI, L., ANTONUCCI, G. y BATTAGLIA, P.A. (1998). Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. **Journal of Food Protection** 61, 513-518.

TAYLOR, A., ERBA, H.P., MUSCAT, G.E.O. y KEDES, L. (1988): Nucleotide sequence and expression of the human skeletal α -actin gene: Evolution of functional regulatory domains. **Genomics** 3, 323-336.

TAYLOR, W.J. y JONES, J.L. (1992). An immunoassay for distinguishing between crustacean tail meat and white fish. **Food and Agricultural Immunology** 4, 177-180.

TERRY, C.F. y HARRIS, N. (2001). Event-specific detection of Roundup Ready Soya using two different real time PCR detection chemistries. **European Food Research and Technology** 213, 425-431.

TERZI, V., FERRARI, B., FINOCCHIARO, F., DI FONZO, N., STANCA, A.M., LAMACCHIA, C., NAPIER, J., SHEWRY, P.R. y FACCIOLI, P. (2003). TaqMan PCR for detection of genetically modified durum wheat. **Journal of Cereal Science** 37, 157-163.

TOOROP, R.M., MURCH, S.J. y BALL, R.O. (1997a). Development of a rapid and accurate method for separation and quantification of myofibrillar proteins in meat. **Food Research International** 30, 619-627.

TOOROP, R.M., MURCH, S.J. y BALL, R.O. (1997b). Methodology and development of prediction equations for the determination of pork substitution in veal. **Food Research International** 30, 629-636.

TYSSEN, P. (1985). Enzymes used in activity amplification assays. En *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. Burdon, R.H. y Van Knippenberg, P.H. (Ed.). Elsevier Applied Science Publishers, Londres, U.K., pp: 174-204.

UNSELD, M., BEYERMANN, B., BRANDT, P. y HIESEL, R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. **PCR Methods and Applications** 4, 241-243.

VAÏTILINGOM, M., PIJNENBURG, H., GENDRE, F. y BRIGNON, P. (1999). Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47, 5261-5266.

VALERO, M.C., DE LUIS, O., CRUCES, J. y JURADO, L.A.P. (2000). Fine-scale comparative mapping of the human 7q11.23 region and the orthologous region on mouse chromosome 5G: The low-copy repeats that flank the Williams-Beuren syndrome deletion arose at breakpoint sites of an evolutionary inversion. **Genomics** 69, 1-13.

VALLEJO-CÓRDOBA, B. y COTA-RIVAS, M. (1998). Meat species identification by linear discriminant analysis of capillary electrophoresis protein profiles. **Journal of Capillary Electrophoresis** 5, 171-175.

VAN DE PEER, Y. y DE WACHTER, R. (1993). TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. **Computer Applications in the Bioscience** 9, 177-182.

VANDEKERCKHOVE, J. y WEBER, K. (1979). The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. **Differentiation** 14, 123-133.

VENKATESH, B. y BRENNER, S. (1997). Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene, a comparative analysis of teleost growth hormone gene. **Gene** 187, 211-215.

VERKAAR, E.L.C., NIJMAN, I.J., BOUTAGA, K. y LENSTRA, J.A. (2002). Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. **Meat Science** 60, 365-369.

VOLLER, A., BIDWEL, D. y BARTLETT, A. (1986). Enzyme-linked immunosorbent assay. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Rose, N.R., Friedman, H. y Fahev, J.L. (Ed.), American Society for Microbiology, Washington D.C., 99-109.

VON HOLST, C., HONIKEL, K.O., UNGLAUB, W., KRAMER, G. y ANKLAM, E. (2000). Determination of an appropriate heat treatment of animal waste using the ELISA technique: results of a validation study. **Meat Science** 54, 1-7.

WALKER, J.A., HUGHES, D.A., ANDERS, B.A., SHEWALE, J., SINHA, S.K. y BATZER, M.A. (2003). Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. **Analytical Biochemistry** 316, 259-269.

WALKER, J.A., HUGHES, D.A., HEDGES, D.J., ANDERS, B.A., LABORDE, M.E., SHEWALE, J., SINHA, S.K. y BATZER, M.A. (2004). Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. **Genomics** 83, 518-527.

WALKER, J.E., ARIZMENDI, J.M., DUPUIS, A., FEARNLEY, I.M., FINEL, M., MEDD, S.M., PILKINGTON, S.J., RUNSWICK, M.J. y SKEHEL, J.M. (1992). Sequence of 20 subunits of NADH: ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. Application of a novel strategy for sequencing proteins using the polymerase chain reaction. **Journal of Molecular Biology** 226, 1051-1072.

WAN, Q-H. y FANG, S-G. (2003). Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. **Forensic Science International** 131, 75-78.

WANG, R-F., MYERS, M.J., CAMPBELL, W., CAO, W-W., PAINE, D. y CERNIGLIA, C.E. (2000). A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feedstuffs. **Molecular and Cellular Probes** 14, 1-5.

WATABE, S., HIRAYAMA, Y., IMAI, J., KIKUCHI, K. y YAMASHITA, M. (1995): Sequences of cDNA clones encoding alpha-actin of carp and goldfish skeletal muscles. **Fisheries Science** 61, 998-1003.

- WATSON, J.D., GILMAN, M., WITKOWSKI, J. y ZOLLER, M. (1992). The polymerase chain reaction. En: *Recombinant DNA*, 2ª ed. Scientific American Books (Ed.), EE.UU., 79-95.
- WATTERS, J.W. y DIETRICH, W.F. (2001). Genetic, physical, and transcript map of the Itxs 1 region of mouse chromosome. **Genomics** 73, 223-231.
- WÄTZIG, H. y DETTE, C. (1994). Capillary electrophoresis (CE) – a review. Strategies for method development and applications related to pharmaceutical and biological sciences. **Pharmazie** 49, 83-96.
- WEBER, K. y KABSCH, W. (1994). Intron positions in actin genes seem unrelated to the secondary structure of the protein. **The EMBO Journal** 13, 1280-1286.
- WEBER, K. y OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry** 244, 4406-4412.
- WELSH, J. y McCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR arbitrary primers. **Nucleic Acids Research** 18, 7213-7218.
- WHITHAKER, R.G., SPENCER, T.L. y COPLAND, J.W. (1982). Enzyme linked immunosorbent assay for meat species testing. **Australian Veterinary Journal** 59, 125.
- WIJERS, E.R., ZIJLSTRA, C. y LENSTRA, J.A. (1993). Rapid evolution of horse satellite DNA. **Genomics** 18, 113-117.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J. y TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18, 6531-6535.
- WINTER, G. y MILSTEIN, C. (1991). Man-made antibodies. **Nature** 349, 293-299.
- WINTER, G., GRIFFITHS, A.D., HAWKINS, R.F. y HOOGENBOOM, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. **Annual Review of Immunology** 12, 433-455.

WOLF, C., RENTSCH, J. y HÜBNER, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47, 1350-1355.

WOLF, C. y LÜTHY, J. (2001). Quantitative (QC) competitive PCR for quantification of porcine DNA. **Meat Science** 57, 161-168.

YOSHIZAKI, G., HIRONO, Y., AOKI, T. y TAKASHIMA, F. (1997). Cloning and sequencing of cDNAs of the β -globin gene family in carp. **Journal of Fish Biology** 51, 1125-1136.

ZAKUT, R., SHANI, M., GIVOL, D., NEUMAN, S., YAFFE, D. y NUDEL, U. (1982). Nucleotic sequence of the rat skeletal muscle actin gene. **Nature** 298, 857-859.

ZEITLER, R., PIETSCH, K. y WAIBLINGER, H-U. (2002). Validation of real-time PCR methods for the quantification of transgenic contaminations in rape seed. **European Food Research and Technology** 214, 346-351.

ZERIFI, A., LABIE, C.H. y BERNARD, G. (1991). SDS-PAGE technique for species identification of cooked meat. **Fleischwirtschaft** 71, 1107-1110.

ZIMMERMANN, S., ZEHNER, R. y MEBS, D. (1999). Identification of animal species in meat samples by DNA-analysis. **Fleischwirtschaft International** 2, 39-42.

CAPÍTULO IX

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<u>Pág</u>
Tabla 1. Productos elaborados a partir del <i>foie gras</i>	15
Tabla 2. Comercio exterior francés de <i>foie gras</i> fresco.....	20
Tabla 3. Comercio exterior francés de <i>foie gras</i> congelado.....	21
Tabla 4. Comercio exterior español de hígados grasos frescos de pato.....	23
Tabla 5. Comercio exterior español de hígados grasos frescos de oca.....	24
Tabla 6. Comercio exterior español de preparados cárnicos que contengan en peso el 75% o más de hígados grasos de oca y pato.....	26
Tabla 7. Comparación entre los métodos de análisis de proteínas y los métodos genéticos para identificación de especies de animales.....	44
Tabla 8. Normas para la selección de cebadores y sondas para análisis de PCR cuantitativo, empleando como ejemplo el software de Primer Express®.....	71
Tabla 9. Matriz de optimización de los cebadores.....	82
Tabla 10. Cebadores empleados para amplificar el gen nuclear 5S ADNr.....	97
Tabla 11. Cebadores empleados para amplificar el gen nuclear α -actina.....	99
Tabla 12. Cebadores empleados para amplificar el gen mitocondrial 12S ARNr.....	100
Tabla 13. Fragmentos génicos delimitados en la oca, pato, pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra con las parejas de cebadores empleadas en este trabajo.....	111
Tabla 14. Reactivos empleados en la reacción de ligación.....	124
Tabla 15. Secuencias de los cebadores y de la sonda utilizados.....	133
Tabla 16. Secuencias de los cebadores y de la sonda utilizados.....	135
Tabla 17. Comparación de las características del ADN obtenido a partir de <i>foie gras</i> , hígado, tejido muscular y grasa utilizando diversos métodos de extracción.....	163
Tabla 18. Especificidad de los sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real específico de pato y pato+oca, empleando 10 ng de ADN.....	199
Tabla 19. Especificidad de los sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real específico de cerdo y control endógeno de mamíferos, empleando 10 ng de ADN.....	208

	<u>Pág</u>
Tabla 20. Resultados del ELISA indirecto en placa obtenidos al enfrentar las proteínas solubles de oca y pato, con los anticuerpos policlonales anti-oca y anti-pato precipitados con sulfato amónico y sin neutralizar.....	217
Tabla 21. Resultados del ELISA indirecto obtenidos al enfrentar las proteínas solubles de oca y pato, con los anticuerpos policlonales anti-oca y anti-pato precipitados con sulfato amónico y neutralizados mediante la técnica de inmunoadsorción.....	217

	<u>Pág</u>
Figura 1. Clasificación taxonómica de pato mulard (<i>Anas platyrhynchos</i> x <i>Cairina muschata</i>), oca (<i>Anser anser</i>), pollo (<i>Gallus gallus</i>), pavo (<i>Meleagris gallopavo</i>), cerdo (<i>Sus scrofa domesticus</i>), vaca (<i>Bos taurus</i>), oveja (<i>Ovis aries</i>) y cabra (<i>Capra hircus</i>).....	9
Figura 2A. Pato Berbería (<i>Cairina muschata</i>).....	10
Figura 2B. Hembras de pato Mallard (variedad Pekín) (<i>Anas platyrhynchos</i>).....	10
Figura 3. Pato mulard (<i>Anas platyrhynchos</i> x <i>Cairina muschata</i>).....	10
Figura 4. Oca de las Landas.....	12
Figura 5. <i>Foie gras</i> entero de pato.....	16
Figura 6. Bloc de <i>Foie gras</i> de pato con trozos.....	16
Figura 7. Técnica de inmunodifusión en geles de agar.....	36
Figura 8. Técnica de ELISA indirecto.....	39
Figura 9. ADN mitocondrial de los animales. O _H y O _L indican los orígenes de replicación de las cadenas H- y L- respectivamente. Los genes que codifican ARN de transferencia (ARNt) se muestran en color azul. La mayoría de los genes del ARNt y todas las proteínas, excepto la ND6, están codificados en la cadena H. Los genes codificados por la cadena L se muestran en la parte externa del círculo.....	46
Figura 10. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	51
Figura 11. Esquema del mecanismo de acción de las moléculas de SYBR® Green.....	73
Figura 12. Esquema del mecanismo de acción de las sondas Taqman®.....	75
Figura 13. Esquema del mecanismo de acción de los cebadores fluorescentes.....	77
Figura 14. Esquema del mecanismo de acción de los cebadores <i>Scorpion</i> TM	78
Figura 15. Esquema del mecanismo de acción de las moléculas fluorescentes.....	79
Figura 16. Esquema del mecanismo de acción de las sondas Light Cycler TM	80
Figura 17. Modelo de amplificación donde se muestran los términos comúnmente usados en el PCR cuantitativo en tiempo real.....	83
Figura 18^A. Gráfico de amplificación donde se representa el incremento de fluorescencia frente al C _T obtenido.....	84
Figura 18^B. Recta patrón donde se representa el log del número de copias inicial frente al valor de C _T obtenido.....	85
Figura 19. Equipos empleados en la cuantificación en tiempo real. 19A) SDS 7700 de Applied Biosystems; 19B) Sistema <i>Lightcycler</i> de Roche; 19C) Sistema de detección de PCR en tiempo real de Bio-Rad.....	86

	<u>Pág</u>
Figura 20. Esquema de la metodología seguida en este trabajo para la Identificación genética de oca, pato mulard, pollo, cerdo, pavo, vaca, oveja y cabra.....	95
Figura 21. Estructura básica del gen 5S ADNr en eucariotas.....	97
Figura 22. Método de extracción de ADN (DeSalle y col., 1993 y DeSalle y col., 1993 modificado).....	102
Figura 23. Método de extracción <i>Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food</i> (Promega)	104
Figura 24. Método de extracción <i>Wizard[®] DNA Clean-up</i> (Promega).....	107
Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de los fragmentos de ADN.....	117
Figura 26. Purificación de productos de PCR utilizando el <i>kit</i> de purificación <i>Qiaquick gel extraction</i> (Qiagen)	119
Figura 27. Mapa circular del vector de clonación <i>pGEM[®] -T Easy</i>	121
Figura 28. Esquema de la clonación de productos de PCR.....	122
Figura 29. Dibujo esquemático de las distintas regiones de una inmunoglobulina y de los distintos fragmentos que pueden emplearse para generar anticuerpos recombinantes (Fab, dsFv y scFv).....	148
Figura 30. Representación esquemática del vector pHen2.....	149
Figura 31. Representación esquemática del proceso de obtención de anticuerpos recombinantes (Adaptado de Rondot y col., 2001).....	153
Figura 32. Representación esquemática del proceso de selección de los bacteriófagos.....	156
Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa de 1µg del ADN obtenido a partir de <i>foie gras</i> de oca (1) y pato (2), utilizando el método de DeSalle y col. (1993) modificado. (M) corresponde al marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>	164
Figura 34. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 5S ADNr amplificados con los cebadores 5S1 y 5S2 a partir de muestras de pato (1) y oca (2). (M) corresponde al marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i> y (CN) al control negativo.....	166
Figura 35. Análisis electroforético de los insertos de ADN amplificados con los cebadores M13F y M13R. Muestras: pato (1) y oca (2). (M) corresponde al marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i> y (CN) al control negativo.....	166

Pág

- Figura 36.** Secuencias de ADN de pato y oca correspondientes a los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos 5S1 y 5S2, y que han sido utilizadas para el diseño de los cebadores 5SG, 5SD y 5S3. La secuencia correspondiente a la zona codificante del gen 5S ADNr está indicada en negrita; el resto de la secuencia corresponde al fragmento espaciador NTS. Los oligonucleótidos 5S1, 5S2 aparecen subrayados. Los cebadores 5S3, 5SG y 5SD aparecen sombreados..... 168
- Figura 37.** Análisis electroforético de los fragmentos del gen 5S ADNr amplificados mediante PCR múltiple utilizando los cebadores 5S3, 5SG y 5SD. Las muestras son: pato (1-6), pollo (7), cerdo (8) y oca (9-14). (CN) corresponde al control negativo. Los tratamientos térmicos son: muestras frescas (1, 2, 7, 8, 9 y 10), pasteurizadas (3, 4) y esterilizadas (5, 6, 11-14). (M) corresponde al marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*..... 169
- Figura 38.** Análisis electroforético de los productos de PCR del gen α -actina amplificados con los cebadores Act2/Act4. Muestras: cerdo (1), pollo (2), pato (3) y oca (4). (CN) control negativo y (M) marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*..... 170
- Figura 39.** Análisis electroforético de los insertos de ADN amplificados con los cebadores M13F y M13R. Muestras: pollo (1-2), cerdo (3-4), pato (5-6) y oca (7-8). (M) marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*..... 171
- Figura 40.** Secuencias de ADN correspondientes a los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos Act2 y Act4 a partir de muestras de oca, pato, pollo y cerdo. Los cebadores Act2 (directo), Act 3 (inverso) y Act4 (inverso) se indican en negrita. Los cebadores específicos de especie (ActG, ActD, ActC y ActP) y el cebador inverso común (actinv) se muestran subrayados. La secuencia de los exones se representa en mayúscula, mientras que la de los intrones se hace en minúscula..... 173
- Figura 41.** Secuencias aminoacídicas correspondientes a los exones comprendidos en los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos Act2 y Act4 a partir de muestras de oca, pato, pollo y cerdo. Los puntos representan identidad con la secuencia superior..... 176
- Figura 42.** Análisis electroforético de los productos de PCR del gen α -actina amplificados con los cebadores ActD/actinv (líneas 1, 8-12) y ActG/actinv (líneas 2-7). Muestras: pato mulard (1, 3), oca (2, 8), pollo (4, 9), cerdo (5, 10), pavo (6, 11) y control negativo (7, 12). (M) marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*..... 177

	<u>Pág</u>
Figura 43. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen α -actina amplificados con los cebadores actinv/ActC (líneas 1-5) y actinv/ActP (líneas 6-10). Muestras: pollo (1, 9), pato mulard (2, 7), oca (3, 8), cerdo (4, 6) y control negativo (5, 10). (M) marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>	178
Figura 44. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen de la α -actina amplificados con los cebadores ActD y actinv a partir de mezclas binarias experimentales frescas (44A), pasteurizadas a 65°C/30 min (44B) y esterilizadas a 120°C/20 min (44C). Las líneas 1 a 7 en todas las imágenes electroforéticas son muestras de <i>foie gras</i> de oca que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y 100% de <i>foie gras</i> de pato. (M) marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>	179
Figura 45. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen de la α -actina amplificados con los cebadores ActC y actinv a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 7 corresponden a mezclas experimentales de <i>foie gras</i> fresco de oca (45A) o <i>foie gras</i> fresco de pato mulard (45B) que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y 100% de hígado fresco de pollo. (M) marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>	180
Figura 46. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen de la α -actina amplificados con los cebadores ActP y actinv a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 7 corresponden a mezclas experimentales de <i>foie gras</i> fresco de oca (46A) o <i>foie gras</i> fresco de pato mulard (46B) que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y 100% de hígado fresco de cerdo. (M) marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>	180
Figura 47. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr, amplificados con los cebadores 12SFW y 12SREV. Muestras: oca (1), pato mulard (2), pollo (3), pavo (4) y cerdo (5). (CN) corresponde al control negativo y (M) al marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>	182
Figura 48. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr, amplificados con los cebadores 12SFWM y 12SSEQ. Muestras: cerdo (1), vaca (2), oveja (3) y cabra (4). (CN) corresponde al control negativo y (M) al marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>	182
Figura 49. Cromatograma y secuencia de nucleótidos de un producto de PCR del gen 12S ARNr de pato, utilizando los oligonucleótido 12SFW y 12SREV como cebadores en la reacción de secuenciación.....	183

Pág

<p>Figura 50. Secuencias de ADN correspondientes a los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos 12SFW y 12SREV a partir de muestras de oca, pato, pollo, cerdo y pavo (números de acceso AJ583550, AJ583548, AJ583547, AJ583551, AJ583549, respectivamente). Los cebadores 12SFW (directo) y 12SREV (inverso) se indican en negrita. Los cebadores específicos 12SG (oca), 12SD (pato), 12SC (pollo), 12ST (pavo) y 12SP (cerdo) aparecen subrayados.....</p>	<p>184</p>
<p>Figura 51. Secuencias de ADN correspondientes a los productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos 12SFWM y 12SSEQ a partir de muestras de cerdo, vaca, oveja y cabra. Los cebadores 12SFWM (directo) y 12SSEQ (inverso) se indican en negrita. Los cebadores específicos 12SP (cerdo), 12SBT (vaca), 12SOA (oveja) y 12SCH (cabra) aparecen subrayados.....</p>	<p>185</p>
<p>Figura 52. Análisis electroforético de los productos de PCR específicos del gen 12S ARNr. 52A) Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SG a partir de ADN de oca (1), pato (2), pollo (3), pavo (4) y cerdo (5). 52B) Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SD a partir de ADN de pato (1), oca (2), pollo (3), pavo (4) y cerdo (5). 52C) Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SC a partir de ADN de pollo (1), pato (2), oca (3), pavo (4) y cerdo (5). 52D) Amplificación con los cebadores 12SFW y 12ST a partir de ADN de pavo (1), pato (2), pollo (3), oca (4) y cerdo (5). 52E) Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SS a partir de ADN de cerdo (1), pato (2), pollo (3), pavo (4) y oca (5). En todas las figuras, las líneas 6, 7, 8, 9 y 10 corresponden a muestras de vaca, oveja, cabra, conejo y caballo, respectivamente. (CN) corresponde al control negativo y (M) marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>.....</p>	<p>187</p>
<p>Figura 53. Análisis electroforético de los productos de PCR específicos del gen 12S ARNr. 53A) Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SS a partir de ADN de cerdo (1), vaca (2), oveja (3) y cabra (4). 53B) Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SBT a partir de ADN de vaca (1), cerdo (2), oveja (3) y cabra (4). 53C) Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SOA a partir de ADN de oveja (1), vaca (2), cerdo (3) y cabra (4). 53D) Amplificación con los cebadores 12SFW y 12SCH a partir de ADN de cabra (1), vaca (2), oveja (3) y cerdo (4). En todas las figuras, las líneas 5, 6, 7, 8 y 9 corresponden a muestras de oca, pato, pollo, caballo y conejo, respectivamente. (CN) corresponde al control negativo y (M) marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>.....</p>	<p>189</p>

Pág

Figura 54. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFW y 12SC a partir de mezclas binarias experimentales frescas (54A y 54B), pasteurizadas (54C) o esterilizadas (54D). Las líneas 1 a 7 son muestras de *foie gras* fresco de oca (54A) o *foie gras* de pato mulard (54B-D), que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y un 100% de hígado de pollo. (M) marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*..... 190

Figura 55. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFW y 12SS a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 7 son muestras de la segunda especie de la mezcla, que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y un 100% de cerdo, respectivamente. **55A)** hígado de cerdo en *foie gras* fresco de oca. **55B)** hígado de cerdo en *foie gras* fresco de pato mulard. **55C)** grasa de cerdo en *foie gras* fresco de oca. (M) marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*..... 191

Figura 56. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFW y 12ST a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 7 son muestras de *foie gras* fresco de oca (56A) y *foie gras* fresco de pato mulard (56B), que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y un 100% de músculo de pavo. (M) marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*..... 192

Figura 57. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFW y 12SD a partir de mezclas binarias pato/oca. Las líneas 1 a 7 son muestras de *foie gras* de oca, que contienen un 0; 0,1; 1; 10; 25; 50 y un 100% de *foie gras* fresco de pato mulard. (M) marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*..... 192

Figura 58. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFWM y 12SCH a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 5 son muestras de músculo fresco (58A) o grasa (58B) de cerdo, que contienen un 0; 1; 5; 10 y un 100% de músculo fresco de cabra. CN= control negativo. (M) marcador de peso molecular *1 Kb plus DNA ladder*..... 193

	<u>Pág</u>
Figura 59. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFWM y 12SBT a partir de mezclas binarias experimentales de vaca/cerdo. Las líneas 1 a 5 son muestras de la segunda especie de la mezcla, que contienen un 0; 1; 5; 10 y un 100% de vaca, respectivamente. 59A) músculo fresco de vaca en músculo de cerdo. 59B) músculo pasteurizado de vaca en músculo de cerdo. 59C) músculo esterilizado de vaca en músculo de cerdo. 59D) músculo fresco de vaca en grasa de cerdo. CN= control negativo. (M) marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>	194
Figura 60. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFWM y 12SS a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 5 son muestras de músculo de vaca, que contienen un 0; 1; 5; 10 y un 100% de músculo de cerdo. 60A) músculo fresco de cerdo en músculo de vaca. 60B) músculo pasteurizado de cerdo en músculo de vaca. 60C) músculo esterilizado de cerdo en músculo de vaca. CN= control negativo. (M) marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>	195
Figura 61. Análisis electroforético de los productos de PCR del gen 12S ARNr amplificados con los cebadores 12SFWM y 12SOA a partir de mezclas binarias experimentales. Las líneas 1 a 5 son muestras de músculo fresco (61A) o grasa (61B) de cerdo, que contienen un 0; 1; 5; 10 y un 100% de músculo fresco de oveja. CN= control negativo. (M) marcador de peso molecular <i>1 Kb plus DNA ladder</i>	196
Figura 62. Alineamiento parcial de las secuencias de ADN correspondientes al gen 12S ARNr de oca (AJ583550) y pato (AJ583548), donde se indica en negrita la posición de la sonda (<i>12SSONDA</i>) y de los cebadores <i>12STAQMANFW</i> (directo), <i>12STAQMANREV</i> (inverso endógeno) y <i>12STAQMANTD</i> (inverso específico) empleados en la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real. Las flechas indican el sentido 5' → 3' de los cebadores y de la sonda Taqman.....	198
Figura 63. Representación de la fluorescencia emitida frente al ciclo de amplificación, al analizar por duplicado diluciones decimales seriadas de ADN de pato con el sistema de PCR en tiempo real específico de pato. 63A) ADN plasmídico de pato. 63B) ADN de <i>foie gras</i> de pato.....	201
Figura 64. Representación de la fluorescencia emitida frente al ciclo de amplificación, al analizar por duplicado mezclas experimentales de <i>foie gras</i> de pato y oca (25, 10, 1 y 0,1% de pato) con los sistemas de PCR en tiempo real específico de pato y control endógeno de pato+oca.....	202

	<u>Pág</u>
Figura 65. Test de linealidad, parámetros de regresión lineal y parámetros de sensibilidad del sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación de pato, utilizando diluciones decimales seriadas (desde 100 ng hasta 0,001 ng) de ADN plasmídico de pato (65A) o de ADN de pato (65B).....	203
Figura 66. Test de linealidad, parámetros de regresión lineal y parámetros de sensibilidad del sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación de pato, utilizando 3 extracciones de ADN diferentes de 3 porcentajes distintos (25, 10 y 1%) de cada mezcla binaria. 66A) Recta de calibrado de la mezcla cruda de <i>foie gras</i> de pato/oca. 66B) Recta de calibrado de la mezcla pasteurizada de <i>foie gras</i> de pato/oca. 66C) Recta de calibrado de la mezcla esterilizada de <i>foie gras</i> de pato/oca.....	204
Figura 67. Alineamiento parcial de las secuencias de ADN correspondientes al gen 12S ARNr de cerdo (AJ583551) y vaca donde se indica en negrita la posición de la sonda (12SSONDAMAMIF) y de los cebadores 12STAQMANFWM (directo), 12STAQMANREVM (inverso endógeno) y 12STAQMANS (inverso específico) empleados en la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real. Las flechas indican el sentido 5'→ 3' de los cebadores y de la sonda Taqman.....	207
Figura 68. Representación de la fluorescencia emitida frente al ciclo de amplificación, al analizar por duplicado diluciones decimales seriadas de ADN plasmídico de cerdo con el sistema de PCR en tiempo real específico de cerdo.....	209
Figura 69. Representación de la fluorescencia emitida frente al ciclo de amplificación, al analizar por duplicado mezclas experimentales de músculo de cerdo y vaca (5, 1 y 0,5% de cerdo) con los sistemas de PCR en tiempo real específico de cerdo y control endógeno de mamíferos.....	211
Figura 70. Test de linealidad, parámetros de regresión lineal y parámetros de sensibilidad del sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación de cerdo, utilizando diluciones decimales seriadas (desde 100 ng hasta 0,01 ng) de ADN plasmídico de cerdo.....	212
Figura 71. Test de linealidad, parámetros de regresión lineal y parámetros de sensibilidad del sistema de PCR en tiempo real para la cuantificación de cerdo, utilizando 3 extracciones de ADN diferentes de 3 porcentajes distintos (5, 1 y 0,5%) de cada mezcla binaria. 72A) Recta de calibrado de la mezcla cruda de músculo de cerdo/vaca. 72B) Mezcla esterilizada de músculo de cerdo/vaca.....	213

CAPÍTULO X

GLOSARIO DE NOMBRES CIENTÍFICOS

GLOSARIO DE NOMBRES CIENTÍFICOS	
Nombre común	Nombre científico
Alce común	<i>Alces alces</i>
Ansar careto	<i>Anser albifrons</i>
Antílope	<i>Antidorcas marsupialis</i>
Búfalo	<i>Bubalus bubalis</i>
Burro	<i>Equus asinus</i>
Caballo	<i>Equus caballus</i>
Cabra	<i>Capra hircus</i>
Camello	<i>Camelus bactrianus</i>
Canguro	<i>Macropus giganteus</i>
Caracol	<i>Helix pomatia</i>
Caracol	<i>Helix lucorum</i>
Caracol africano	<i>Achatina fulica</i>
Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>
Carpín	<i>Carassius auratus</i>
Cerdo	<i>Sus scrofa domesticus</i>
Cherna	<i>Polyprion americanus</i>
Ciervo axis	<i>Axis axis ceylonensis</i>
Ciervo común	<i>Cervus elaphus</i>
Ciervo mulo	<i>Odocoileus hemionus hemionus</i>
Ciervo porcino	<i>Axis porcinus oryzus</i>
Ciervo sika	<i>Cervus nippon</i>
Codorniz	<i>Coturnix coturnix</i>
Conejo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
Corzo	<i>Capreolus capreolus</i>
Emú	<i>Dromanius novaehollandiae</i>
Fletán negro	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>
Foca	<i>Phoca groenlandica</i>
Gamo común	<i>Dama dama</i>
Gato	<i>Felis catus</i>
Gorrión	<i>Passer montanus</i>
Íbice	<i>Capra ibex</i>
Jabalí	<i>Sus scrofa</i>
Lenguado	<i>Solea solea</i>
Mapache	<i>Nyctereutes procyonoides procyonoides</i>
Mosca	<i>Drosophila melanogaster</i>
Mero	<i>Epinephelus guaza</i>
Muntjac indio	<i>Muntjac muntjac vaginalis</i>
Muntjak	<i>Muntiacus muntjak malabaricus</i>
Ñu	<i>Connochaetes spp.</i>

GLOSARIO DE NOMBRES CIENTÍFICOS (continuación)	
Nombre común	Nombre científico
Oca	<i>Anser anser</i>
Oveja	<i>Ovis aries</i>
Pato común	<i>Anas platyrhynchos</i>
Pato Berbería	<i>Cairina muschata</i>
Pato Mulard	<i>Anas platyrhynchos x Cairina muschata</i>
Pavo	<i>Meleagris gallopavo</i>
Perca	<i>Lates niloticus</i>
Perro	<i>Canis familiaris</i>
Pollo	<i>Gallus gallus</i>
Rata	<i>Rattus rattus</i>
Ratón	<i>Mus musculus</i>
Rebeco	<i>Rupicapra rupicapra</i>
Reno/Caribú	<i>Rangifer tarandus</i>
Rorcual común	<i>Balaenoptera physalus</i>
Rorcual del norte	<i>Balaenoptera borealis</i>
Rorcual rostrado	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>
Salmón	<i>Salmo salar</i>
Sambar	<i>Cervus unicolor unicolor</i>
Tigre	<i>Panthera tigris</i>
Trucha	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Vaca	<i>Bos taurus</i>
Venado	<i>Cervus spp.</i>
Visón	<i>Bison bison</i>
Yak	<i>Bos grunniens</i>
Zorro ártico	<i>Alopex lagopus</i>
Zorro rojo	<i>Vulpes vulpes</i>
Zorzal	<i>Turdus naumanni</i>

CAPÍTULO XI

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A	Adenina
A_{230nm}	Absorbancia a 230 nm de longitud de onda
A_{260nm}	Absorbancia a 260 nm de longitud de onda
A_{280nm}	Absorbancia a 280 nm de longitud de onda
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolina) sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNbc	ADN bicatenario
ADNc	ADN complementario
ADNn	ADN nuclear
ADNmc	ADN monocatenario
ADNmt	ADN mitocondrial
Anti-oca	Anticuerpos policlonales obtenidos frente a las proteínas solubles de oca
Anti-pato	Anticuerpos policlonales obtenidos frente a las proteínas solubles de pato
AOAC	<i>Association of Oficial Analytical Chemists</i>
APPCC	Análisis de peligros y puntos de control crítico
AP-PCR	<i>Arbitrarily Primed PCR</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosin trifosfato
BOE	Boletín Oficial del Estado
BSA	Seroalbúmina bovina
C	Citosina
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CIFOG	<i>Comité Interprofesional Francés de Palmípedas Grasas</i>

CO	Citocromo oxidasa
C_t	<i>Threshold cycle</i> Ciclo umbral
DAF	<i>DNA Amplification Fingerprinting</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
EC	Electroforesis capilar
ECZ	Electroforesis capilar de zona
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FINS	Forensically Informative Nucleotide Sequencing
G	Guanina
GCG	Genetic Computer Group
GH	<i>Growth Hormone</i> Hormona del Crecimiento
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IEF	Isoelectroenfoque
JORF	<i>Journal Officiel de la République Française</i>
ND	NADH deshidrogenasa
NTS	<i>Non transcriber spacer</i> Fragmento espaciador no codificante

O-NPG	Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
OFIVAL	<i>Office National Interprofessionel des Viandes, de l'Elevage et de l'Aviculture</i>
OMG	Organismo modificado genéticamente
OPD	Orto-fenildiamina
P-NPP	Para-nitrofenil
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RFLP	<i>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR
PCR-SSCP	<i>PCR-Single Strand Conformational Polymorphism</i> Polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN de regiones amplificadas por PCR
PEG	Polietilenglicol
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> Polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR
R_n	Nivel de fluorescencia
RP-HPLC	<i>Reverse Phase HPLC</i> Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa
SDS	Dodecil sulfato sódico y sistema de detección de secuencias

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
S_f	Sangría final
SSCP	<i>Single Strand Conformational Polymorphism</i> Polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN
T	Timina
T_a	<i>Annealing Temperature</i> Temperatura de hibridación
T_m	<i>Melting temperature</i> Temperatura de fusión
Tm	Toneladas métricas
TMB	3,3', 5, 5'-tetrametilbenzidina
UNG	Enzima AmpErase® Uracil N-glicosilasa
UV	Ultravioleta