

**TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL GEN MITOCONDRIAL *Cyt b*,
COMO HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA DE
TEJIDO ANIMAL: FASE II, IDENTIFICACIÓN DE CARNES CRUDAS O
PROCESADAS DE PRESUNTO ORIGEN BOVINO, DE PRODUCCIÓN Y
EXPENDIO EN BUCARAMANGA Y EL ÁREA METROPOLITANA**

NERY MARGARITA FRANCO GAITÁN

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2012**

**TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL GEN MITOCONDRIAL *Cyt b*,
COMO HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA DE
TEJIDO ANIMAL: FASE II, IDENTIFICACIÓN DE CARNES CRUDAS O
PROCESADAS DE PRESUNTO ORIGEN BOVINO, DE PRODUCCIÓN Y
EXPENDIO EN BUCARAMANGA Y EL ÁREA METROPOLITANA**

NERY MARGARITA FRANCO GAITÁN

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

Director

JORGE HERNÁNDEZ TORRES, Ph. D.

Codirector

ORIANA DANUTA SERNA DAZA

Bióloga

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2012

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Introducción.....	12
Marco teórico.....	14
1. Materiales y métodos.....	17
1.1 Muestreo.....	17
1.2 Extracción de DNA total.....	17
1.3 Amplificación de un fragmento del gen <i>Cyt b</i>	17
1.4 Construcción de librerías.....	18
1.5 Tipificación de las secuencias.....	18
2. Resultados.....	20
2.1 Muestreo.....	20
2.2 Extracción de DNA total.....	20
2.3 Amplificación de un fragmento del gen <i>Cyt b</i>	22
2.4 Construcción de librerías.....	22
2.5 Tipificación de las secuencias.....	23
3. Discusión.....	34
4. Conclusiones.....	36
Bibliografía.....	37
Anexo A. Secuencias de referencia usadas para la construcción de la matriz de distancia y árboles de distancia genética.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Extracciones de DNA total de carnes y derivados cárnicos de presunto origen bovino.....	20
Figura 2. Amplificados purificados de un fragmento de ~376 pb del gen <i>Cyt b</i>	22
Figura 3. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 3.....	23
Figura 4. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 29....	24
Figura 5. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 155...	24
Figura 6. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 39.....	25
Figura 7. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 88.....	26
Figura 8. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 207....	26
Figura 9. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 80.....	27
Figura 10. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 90.....	28

Figura 11. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 140.....	28
Figura 12. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 185.....	29
Figura 13. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 192.....	29
Figura 14. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 159....	30
Figura 15. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de <i>Cyt b</i> para la muestra 138.....	31
Figura 16. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del gen <i>Cyt b</i> normal en el clon 148c (superior) y pseudogen en el clon 185a (inferior).....	32

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Detalle por muestra: cárnico, estado, presunto origen y distancia genética con la especie identificada.....	21

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Secuencias de referencia usadas para la construcción de la matriz de distancia y árboles de distancia genética.....	47

RESUMEN

TÍTULO: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL GEN MITOCONDRIAL *Cyt b*, COMO HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA DE TEJIDO ANIMAL: FASE II, IDENTIFICACIÓN DE CARNES CRUDAS O PROCESADAS DE PRESUNTO ORIGEN BOVINO, DE PRODUCCIÓN Y EXPENDIO EN BUCARAMANGA Y EL ÁREA METROPOLITANA*.

AUTOR: NERY MARGARITA FRANCO GAITÁN**

PALABRAS CLAVE: Tipificación, gen *Cyt b*, secuenciación.

DESCRIPCIÓN: La identificación de especies en alimentos para el consumo humano es de gran interés debido a factores como crisis sanitarias, sustitución fraudulenta de una especie por otra de menor costo, protección a especies en peligro de extinción y el respeto a los estilos de vida o religión. En el área metropolitana de Bucaramanga se han hallado mataderos clandestinos que operan en condiciones insalubres, algunos de los cuales se especializan en sacrificar burros y caballos enfermos o seniles, para venderlos por carne de res. Para evitar que los consumidores pongan en riesgo su salud y contrarrestar la sobre-explotación y el tráfico ilegal en el mercado de animales bajo protección, se hace necesario el desarrollo de métodos precisos para identificar las especies animales en las carnes crudas y procesadas. El propósito de este trabajo de grado es realizar la identificación del origen especie-específico de tejido animal crudo o procesado presuntamente bovino, de producción y expendio en Bucaramanga y el Área Metropolitana, mediante secuenciación del gen mitocondrial *Cyt b*. En las muestras de carne de origen presuntamente bovino colectadas en el Área Metropolitana, se encontró sustitución de carne de res por carne de cerdo en un 26%. En muestras de los cárnicos vendidos bajo una marca registrada, se observan en varios casos que aunque se comercializa como carne de res, contiene también carne de cerdo.

*Proyecto de Investigación.

**Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Director Dr. Jorge Hernández Torres. Codirector Oriana Danuta Serna Daza.

ABSTRACT

TITLE: MOLECULAR TYPIFICATION OF MITOCHONDRIAL *Cyt b* GENE, AS A TOOL FOR IDENTIFICATION OF SPECIES-SPECIFIC MEATS: PHASE II, IDENTIFICATION OF RAW AND PROCESSED BOVINE MEAT, PRODUCED AND SOLD IN BUCARAMANGA AND METROPOLITAN*

AUTHOR: NERY MARGARITA FRANCO GAITÁN**

KEYWORDS: Typing, *Cyt b* gene, sequencing.

DESCRIPTION: Species identification of food for human consumption is of great interest because of factors such as health crises, fraudulent substitution of one species by another of lower cost, protection of endangered species and respect of lifestyles or religion. In the metropolitan area of Bucaramanga, illegal slaughterhouses were found to operate in unsanitary conditions, some of which specialize in sick or senile donkeys and horses, but sold as beef. To protect health consumers and reverse the over-exploitation and illegal trade of protected animal market, it is necessary to develop accurate methods to identify the animal origin of raw and processed meats. The purpose of this work is to identify the species-specific origin of raw and processed animal tissue supposed to be bovine, of production and sale in Bucaramanga and the Metropolitan Area, by sequencing the mitochondrial *Cyt b* gene. Substitution of pork by beef was found in 26% of meat samples. In some samples of the meat sold under a trademark, it is observed that marketed beef meat also contains pork.

*Research Project.

**Science Faculty. School of Biology. Director Dr. Jorge Hernández Torres. Codirector Oriana Danuta Serna Daza.

INTRODUCCIÓN

El consumo de carne de res en Colombia, evaluado dentro del costo de la canasta familiar del DANE, representa el 9% del total de gastos en alimentos (el 2.5% del gasto total familiar) y se estima un consumo per cápita de carne bovina de aproximadamente 18,7 Kg por persona¹.

En la última década, crisis sanitarias por contaminación microbiana, brotes de encefalopatía espongiforme bovina (EEB), influenza aviar, influenza porcina y la contaminación por dioxinas, han generado pánico entre los consumidores. Como resultado ha ocurrido una reducción drástica del consumo de carne de res, cerdo y aves de corral y se ha incrementado el interés en la identificación de especies en alimentos para el consumo humano²⁻⁴.

La identificación especie-específica de carnes de consumo humano es importante por varios factores: i) Minimizar riesgos en la salud del consumidor ocasionados por la sustitución de una especie comestible por otra, sacrificada en pésimas condiciones de higiene. ii) Evitar el fraude comercial que se presenta al sustituir una especie comestible por otra de menor costo económico⁵. iii) Proteger las especies animales silvestres: el comercio ilegal de este tipo de animales puede incrementar los riesgos de contagio de graves enfermedades y supone agotamiento de la biodiversidad⁶. iii) Amparar el respeto a los derechos de los consumidores, a sus intereses personales relacionados con su estilo de vida, sea vegetariano o religioso (prohibición del consumo de carne de cerdo para judíos y musulmanes)⁷.

En diferentes ciudades de Colombia, incluyendo Bucaramanga y su Área Metropolitana, se han descubierto mataderos clandestinos que operan en condiciones insalubres, incumpliendo con los requerimientos mínimos sanitarios para el sacrificio de animales y dedicados al comercio ilícito de carne de asnos

(*Equus asinus*) y caballos (*Equus caballus*) enfermos o seniles. Representando un peligro para la salud de los consumidores y pérdidas económicas a quienes sí cumplen con la legislación⁸⁻²⁰. Ante este tipo de fraude, se pone en riesgo la salud de los consumidores y se manifiesta la necesidad de implementar metodologías que permitan determinar las especies biológicas presentes en carnes crudas y procesadas, para proteger tanto a los consumidores como a los productores legales. Además, se lograría evitar la sobre-explotación y el tráfico ilegal de animales bajo protección o en peligro de extinción.

En Colombia, hasta el momento, se han hecho esfuerzos en este sentido, con la identificación de especies susceptibles de expendio al público basados en PCR-RFLP²¹. Sin embargo, es la primera vez que se aplica la secuenciación de genes para la implementación de una prueba piloto de tipificación de carnes en el país.

El propósito de este trabajo de grado es realizar la identificación del origen especie-específico de tejido animal crudo o procesado presuntamente bovino, de producción y expendio en Bucaramanga y el Área Metropolitana, mediante secuenciación del gen mitocondrial *Cyt b*.

MARCO TEÓRICO

Genes mitocondriales para la identificación de especies

En animales, el genoma mitocondrial (mtDNA) es generalmente pequeño (15-20 kb), conformado por 37 genes: 13 codifican para subunidades relacionadas con procesos de fosforilación oxidativa, dos rRNAs del ribosoma mitocondrial y 22 RNA de transferencia (tRNAs) necesarios para la traducción de las proteínas codificadas por el mtDNA²².

A nivel evolutivo, las secuencias de mtDNA evolucionan más rápidamente en comparación con el DNA nuclear. La razón principal es la ineficiencia inherente al sistema de reparación de los errores de replicación y daño del DNA, resultando en la acumulación de variabilidad interespecífica²³.

Aunque las secuencias mitocondriales evolucionan rápidamente, el ordenamiento de los genes permanece sin cambio por largos periodos de tiempo evolutivo, siendo relativamente estables dentro de grupos principales, pero variables entre ellos. Por ello, comparaciones a nivel de secuencias de genes específicos permiten la identificación especie-específica de muestras²².

El uso de mtDNA para la identificación de especies mediante PCR ofrece una serie de ventajas sobre marcadores genéticos presentes en el DNA nuclear^{24, 25}. En efecto, la detección genómica podría ser limitada por el número de copias generalmente baja de secuencias. Por el contrario, el mtDNA presenta varias copias por célula, lo cual incrementa la probabilidad de detectar una secuencia específica en muestras altamente procesadas, con daño en el DNA. Aun cuando el mtDNA esté presente en pequeñas cantidades, se incrementa la oportunidad de amplificar fragmentos de DNA en buen estado⁴.

Identificación especie-específica basada en el gen Cyt b

A partir de la década de 1980, se han desarrollado técnicas moleculares e inmunológicas para la identificación de especies en productos alimenticios de consumo humano. Inicialmente, muchas pruebas estuvieron dirigidas hacia la identificación de fracciones de proteínas, incluyendo inmunoensayos²⁶, isoelectroenfoque (IEF)^{27, 28} y la prueba de ELISA²⁹. Sin embargo, estas técnicas han sido paulatinamente abandonadas debido a su baja especificidad y su ineficacia en el caso de alimentos procesados mediante refrigeración, salado y secado. El calor, el factor más importante, induce marcadas modificaciones estructurales en las proteínas que alteran los resultados basados en el análisis, como ELISA, HPLC y especialmente IEF⁴. Aunque el análisis de proteínas es muy usado para la evaluación de productos frescos, no es efectivo para productos altamente procesados, al resultar desnaturalizadas³⁰.

El rápido adelanto de los métodos basados en DNA ha reorientado los métodos de autenticación de alimentos desde el análisis de proteínas al del DNA^{31, 32}. El DNA tiene la ventaja de ser una molécula relativamente estable, capaz de soportar el procesamiento por calor y presión, y se encuentra presente en todos los tejidos de un individuo³³.

Entre los protocolos que utilizan DNA, la PCR es la técnica molecular más practicada hasta ahora y provee una forma sencilla, rápida, sensible y específica de detectar orígenes biológicos en alimentos³⁴. La variedad de métodos es amplia: Secuenciación de nucleótidos forense informativa (FINS)^{35, 36}, microsatélites (SSR)³⁷, polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP)³⁸, polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)³⁹, así como polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) usando como blanco genes mitocondriales, como el de la proteína citocromo b (*Cyt b*)^{40, 41}.

El gen *Cyt b* consiste de secuencias conservadas y ha sido bien caracterizado en diferentes grupos de vertebrados, permitiendo el reconocimiento de variación genética entre especies⁴².

El amplio uso del gen *Cyt b* ha hecho de éste una herramienta valiosa en estudios filogenéticos⁴³⁻⁴⁵, de diferenciación de especies presentes en alimentos crudos y procesados⁴⁶⁻⁵¹ y en la identificación forense⁵²⁻⁵⁵.

De igual manera el gen *Cyt b* ha sido utilizado con éxito en estudios de identificación del origen biológico de especies tales como, peces^{56, 57}, cefalópodos⁵⁸ y mariscos⁵⁹.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Muestreo

Se compraron en Bucaramanga y su Área Metropolitana 50 muestras aleatorias de carne de res y derivados cárnicos de origen local, en establecimientos comerciales distribuidores de carnes crudas y procesadas.

Las muestras se registraron, transportaron y almacenaron de acuerdo con los métodos de muestreo previamente establecidos en nuestro laboratorio²¹.

1.2 Extracción de DNA total

Se realizaron extracciones de DNA total a partir de 25 mg de tejido animal y 10 µL para las muestras de sangre, mediante el kit de extracción DNeasy Tissue® (Qiagen), de acuerdo con la recomendación del fabricante.

1.3 Amplificación de un fragmento del gen *Cyt b*

Un fragmento de ~307 pb del gen *Cyt b* fue amplificado mediante PCR, con los oligonucleótidos universales L14841* y H15149**⁶⁰. La mezcla de reacción de amplificación de 25 µl contenía 1x Taq Buffer (750 mM Tris-HCl (pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.18 µM de cada oligonucleótido, 1.25 U *Taq* polimerasa (Thermo Scientific®) y 50-100 ng de ADN total.

Las condiciones de amplificación fueron: 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 45 s a 94°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C; 1 min a 72°C. La reacción de amplificación se realizó con un termociclador Swift MaxPro® (Esco).

*(5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3')

**(5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3')

Los productos amplificados fueron visualizados en geles 1% agarosa coloreados con EZ Vision III® (Amresco Inc.) y purificados con columnas GeneJET® (Thermo Scientific). La cuantificación se hizo con el software Launch Doc-ITLS (UVP Bio Doc-It Imaging System, Upland, CA, USA) a partir de fotografías realizadas a los geles de los purificados.

En el caso de las carnes crudas, los amplificados purificados fueron secuenciados directamente con los oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR; este servicio fue contratado con la empresa MacroGen (Corea).

1.4 Construcción de librerías

En el caso de productos cárnicos procesados en los cuales se evidenció una mezcla homogenizada de carnes, los amplificados fueron clonados en el vector pGEMTeasy® (Promega). Con el producto de las ligaciones, se transformaron células competentes de *E. coli* JM109, siguiendo las instrucciones del manual del usuario.

A partir de colonias sembradas en medio LB, se seleccionaron recombinantes de cada muestra y se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico siguiendo el método de Zhou et al.⁶¹ Para la secuenciación de los insertos se utilizó el *primer* del vector pGEMTeasy® (Promega), este servicio fue contratado con la empresa MacroGen (Corea).

1.5 Tipificación de las secuencias

Las secuencias fueron editadas a mano y con el programa BioEdit⁶², para evitar quimeras y todo artefacto experimental. Se realizaron búsquedas de secuencias homólogas en la base de datos de GenBank⁶³ con la aplicación BlastN⁶⁴. Por otra parte un análisis de alineamientos globales entre la secuencia nucleotídica de

cada muestra y las encontradas en una base de datos local de especies animales, permanentemente actualizada en el laboratorio, mediante MUSCLE⁶⁵.

Se realizó una matriz de distancia de Tamura-Nei usando MEGA 5⁶⁶ bajo el método Neighbor-Joining⁶⁷. Con base en lo propuesto por Ratnasingham & Hebert⁶⁸, se utilizó como criterio de identificación positiva a nivel de especie, valores de distancia genética menores al 1% (0.01), y a nivel de género, valores menores al 3% (0.03).

En el caso de las muestras en las que se presentaron hallazgos, se construyeron árboles de similitud por la ejecución de matrices de distancia de Tamura-Nei usando MEGA 5⁶⁶ bajo el método Neighbor-Joining⁶⁷.

2. RESULTADOS

2.1 Muestreo

Se compraron de manera aleatoria 50 muestras de carne de res y derivados cárnicos en Bucaramanga y su Área Metropolitana; se tomaron datos del origen biológico registrado en la etiqueta cuando ésta estaba presente (Tabla 1). Las muestras 138 y 159, a pesar de ser vendidas como carne de res, en su etiqueta se reportaba contener carne de res y carne de cerdo.

2.2 Extracción de DNA total

A pesar de los estados de las diferentes muestras, la mayoría de las cuales había pasado por procesos de sazonado y cocción, se obtuvo DNA total de buena calidad para amplificación, mediante el kit de extracción DNeasyTissue® (Qiagen). En la Fig. 1 se observan diferentes muestras de DNA total de alto peso molecular. No se puede distinguir el DNA mitocondrial pero se asume que está contenido en la muestra.

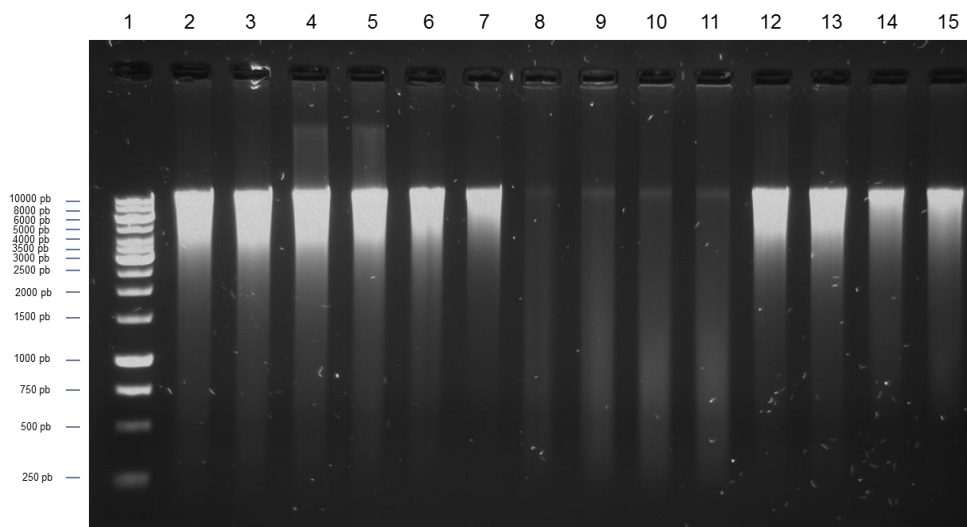


Figura 1. Extracciones de DNA total de carnes y derivados cárnicos de presunto origen bovino. 1 GenRuler 1Kb (Thermo Scientific). 2 Carne cruda. 3 Carne molida. 4 Chanfaina. 5 Chorizo. 6 Longaniza. 7 Génova. 8 Pichón. 9 Gulash. 10 Carne en empanada. 11 Carne en tamal. 12 Albóndigas. 13 Hamburguesa. 14 Salchicha. 15 Pincho.

Tabla 1. Detalle por muestra: cárnico, estado, presunto origen, y distancia genética con la especie identificada.

Número de muestra	Cárnico	Estado	Presunto origen	Distancia genética*				Clon a	Clon b	Clon c	Clon d	Especie en la muestra	Número de muestra
				Secuencias únicas	Descripción	D. G. *	D. G. *	Descripción	D. G. *	Descripción	D. G. *		
2	Carne de res	Crudo	Res				0.000	Bos taurus	0.000	Bos taurus	0.003	Bos taurus	2
3	Chorizo	Crudo	Res				0.000	Sus scrofa	0.000	Sus scrofa	0.000	Sus scrofa	3
6	Carne de res	Hueso Crudo	Res		Bos taurus	0.013						Bos sp.	6
8	Carne de res	Crudo	Res		Bos taurus	0.000						Bos taurus	8
10	Chantafina	Crudo	Res									Bos taurus	10
16	Empanada	Frita	Res									Bos taurus	16
18	Longaniza	Embutido	Res									Bos taurus	18
25	Carne molida	Crudo	Res									Bos taurus	25
26	Chantafina	Crudo	Res									Bos taurus	26
27	Carne de res	Hueso Crudo	Res									Bos taurus	27
29	Chorizo	Embutido	Res									Bos taurus y Sus scrofa	29
30	Carne de res	Crudo	Res									Bos taurus	30
39	Genova Florida (Oreada)	Embutido	Res									Bos taurus	39
41	Genova	Embutido	Res									Bos taurus	41
42	Carne molida	Crudo	Res									Bos taurus	42
68	Carne molida	Crudo	Res									Bos taurus	68
80	Pichón	Cocido	Res									Bos taurus y Sus scrofa	80
85	Carne de res	Crudo	Res		Bos taurus	0.023						Bos sp.	85
88	Chantafina	Crudo	Res									Bos taurus	88
90	Carne molida	Crudo	Res									Bos taurus y Sus scrofa	90
96	Carne de res	Crudo	Res									Bos sp.	96
98	Carne molida	Crudo	Res									Bos taurus	98
122	Hamburguesa	Procesado	Res									Bos taurus	122
128	Tanai	Procesado	Res									Bos taurus	128
134	Carne molida	Crudo	Res									Bos taurus	134
135	Carne de res	Crudo	Res		Bos taurus	0.000						Bos taurus	135
137	Chantafina	Crudo	Res									Bos taurus	137
138	Hamburguesa	Precocido	Res, cerdo									Bos taurus, Bubalus bubalis y Sus scrofa	138
140	Hamburguesa	Crudo	Res									Bos taurus y Sus scrofa	140
142	Albondigas en salsa de tomate	Enlatado	Res									Bos taurus	142
148	Carne molida	Crudo	Res									Bos taurus	148
154	Carne de res	Crudo	Res		Bos taurus	0.000						Bos taurus	154
155	Chorizo	Embutido	Res									Bos taurus y Sus scrofa	155
156	Hamburguesa	Procesado	Res									Bos taurus	156
159	Hamburguesa mixta precocida	Precocido	Res, cerdo									Bos taurus y Sus scrofa	159
179	Carne molida	Crudo	Res									Bos taurus y Sus scrofa	179
180	Carne gulash	Crudo	Res									Bos taurus	180
185	Empanada	Cocido	Res									Bos sp.	185
192	Tanai	Procesado	Res									Bos taurus y Sus scrofa	192
194	Empanada	Precocido	Res									Bos taurus y Sus scrofa	194
207	Salchicha	Embutido	Res									Bos taurus	207
227	Hamburguesa	Cocido	Res									Bos taurus	227
234	Pincho	Cocido	Res									Bos taurus	234
243	Hamburguesa	Cocido	Res									Bos taurus	243
247	Pincho	Cocido	Res									Bos taurus	247
248	Hamburguesa	Cocido	Res									Bos taurus	248
251	Hamburguesa	Cocido	Res									Bos taurus	251
252	Hamburguesa	Cocido	Res									Bos taurus	252
255	Hamburguesa	Cocido	Res									Bos taurus	255
264	Perro caliente	Cocido	Res									Bos taurus	264

Convenciones			
	Pseudogenes		
	Muestras con especies no reportadas		
	Muestra en la que se reporta contener cerdo		

2.3 Amplificación parcial del gen *Cyt b*

Se amplificó mediante PCR un fragmento de ~376 pb del gen *Cyt b* de cada una de las muestras. La calidad de los amplificados fue verificada en geles 1% agarosa coloreados con EZ Vision III® (Amresco Inc.). En la Fig. 2 se observa DNA de la secuencia amplificada y purificada del fragmento del gen mitocondrial *Cyt b* de diferentes muestras.

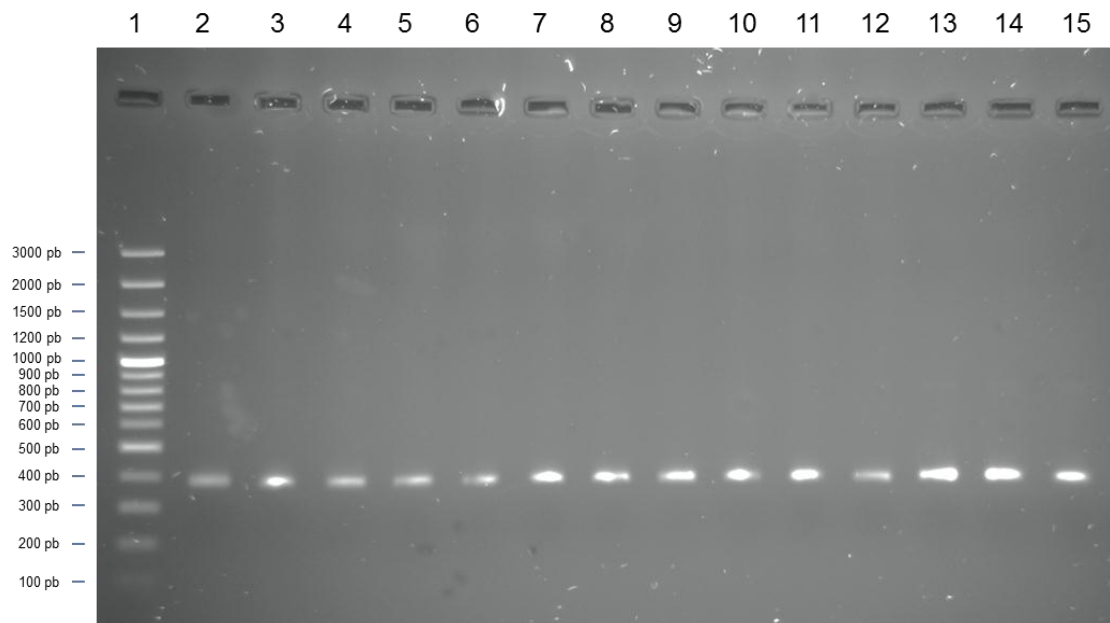


Figura 2. Amplificados purificados de un fragmento de ~376 pb del gen *Cyt b*.

1 GenRuler 1Kb (Thermo Scientific). 2 Carne cruda. 3 Carne molida. 4 Chanfaina. 5 Chorizo. 6 Longaniza. 7 Génova. 8 Pichón. 9 Gulash. 10 Carne en empanada. 11 Carne en tamal. 12 Albóndigas. 13 Hamburguesa. 14 Salchicha. 15 Pincho.

2.4 Construcción de librerías

Con los amplificados de 43 muestras de cárnicos procesados, se realizaron librerías genómicas. De cada librería se seleccionaron 4 plásmidos recombinantes para secuenciación de los insertos correspondientes. Se consideró suficiente el número de 4 clones por muestra, para observar si se encontraba más de una especie en el cárnico.

2.5 Tipificación de las secuencias

En el Anexo 1 se registran las secuencias de referencia usadas para la construcción de la matriz de distancia y los árboles de distancia genética. En la tabla 1 puede observarse el detalle por muestra: cárnico, estado, presunto origen, distancia genética con la especie identificada y finalmente la identificación de las diferentes muestras. De los 50 cárnicos colectados se identificaron 46 a nivel de especie, de los cuales 33 fueron tipificados como *Bos taurus*, 4 como *Sus scrofa*, 8 como una mezcla de *Bos taurus* y *Sus scrofa*, 1 como una mezcla de *Bos taurus*, *Bubalus bubalis* y *Sus scrofa*; 4 muestras fueron identificadas a nivel de género como *Bos sp.*

El principal hallazgo en los cárnicos bovinos fue la sustitución o mezcla de carne de res con carne de cerdo, en el 26% de las muestras. En el caso de las muestras de chorizos, se observó tanto sustitución como mezcla de carne de res y cerdo. En la muestra 3 (Fig. 3) solo se evidenció la presencia de carne de cerdo (*S. scrofa*) y en el caso de las muestras 29 (Fig. 4) y 155 (Fig. 5) una mezcla entre carne de res (*B. taurus*) y carne de cerdo (*S. scrofa*).

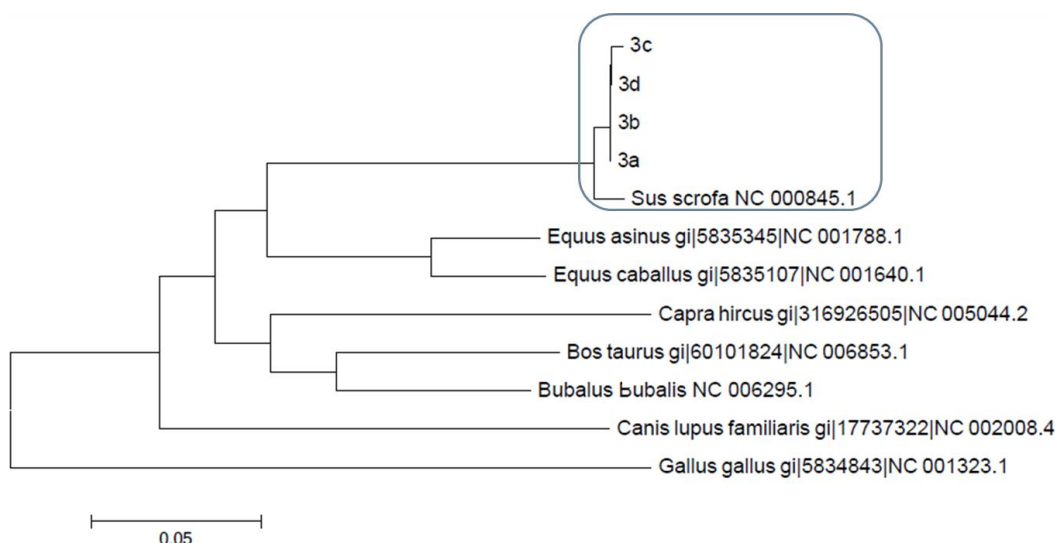


Figura 3. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 3.

En la Fig. 4 puede observarse el agrupamiento de dos clones de la muestra 29 con *Bos taurus* y los otros dos con *Sus scrofa*.

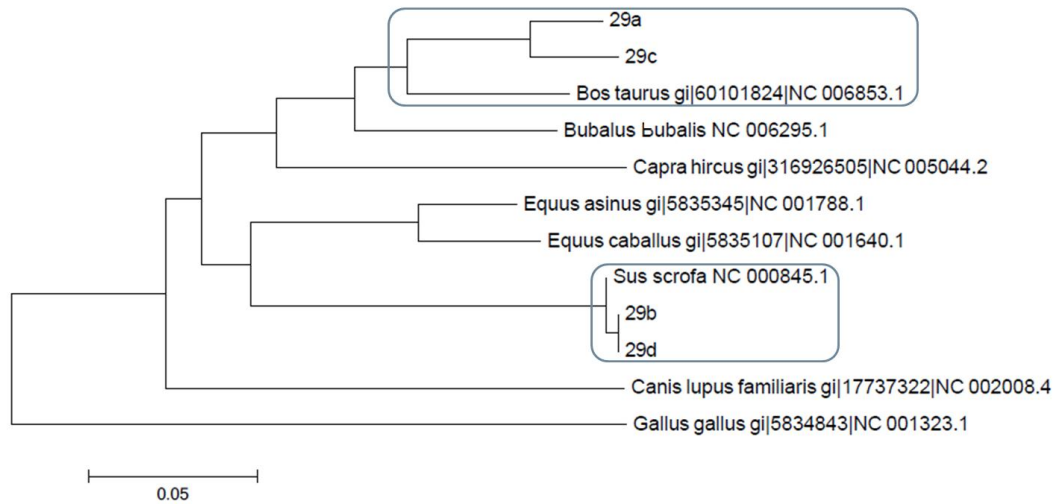


Figura 4. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 29.

En la Fig. 5 se revela igualmente la agrupación de 3 clones de la muestra 155 con la secuencia de *Sus scrofa* y un clon con la secuencia de *Bos taurus*.

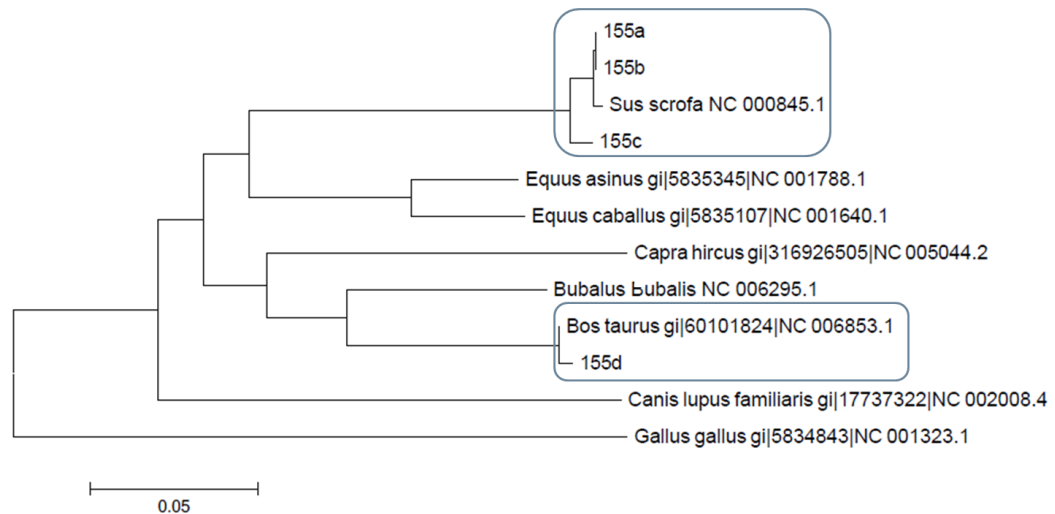


Figura 5. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 155.

A su vez, se evidenció la sustitución de carne de cerdo (*S. scrofa*) por carne de res (*B. taurus*) en otro tipo de derivados cárnicos, específicamente las muestras 39 (génova), 88 (chanfaina) y 207 (salchicha), en las que se halló cerdo en su totalidad.

En la Fig. 6 puede apreciarse el agrupamiento entre los 4 clones de la muestra 39 y la secuencia de *S. scrofa*.

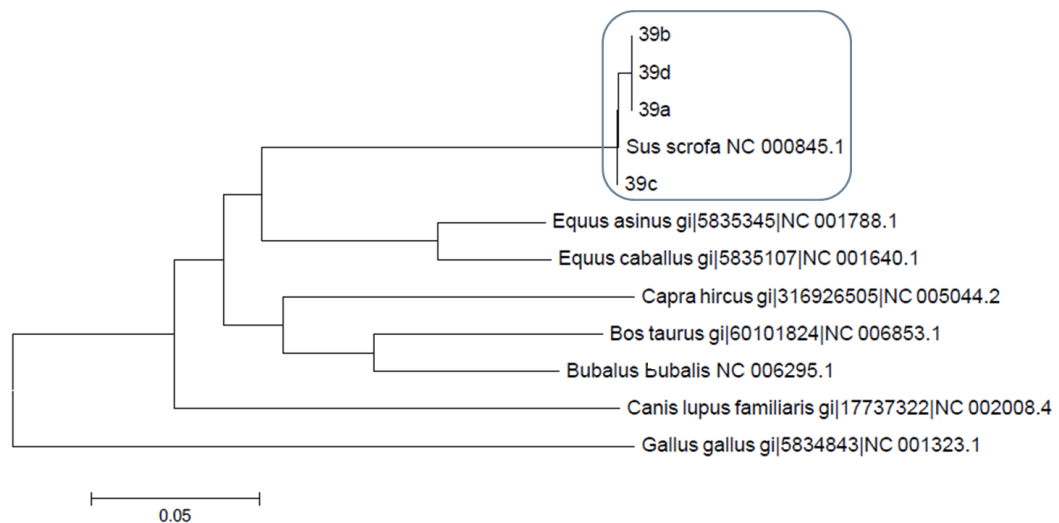


Figura 6. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 39.

En la Fig. 7 puede evidenciarse el agrupamiento entre los 4 clones de la muestra 88 y la secuencia de *S. scrofa*.

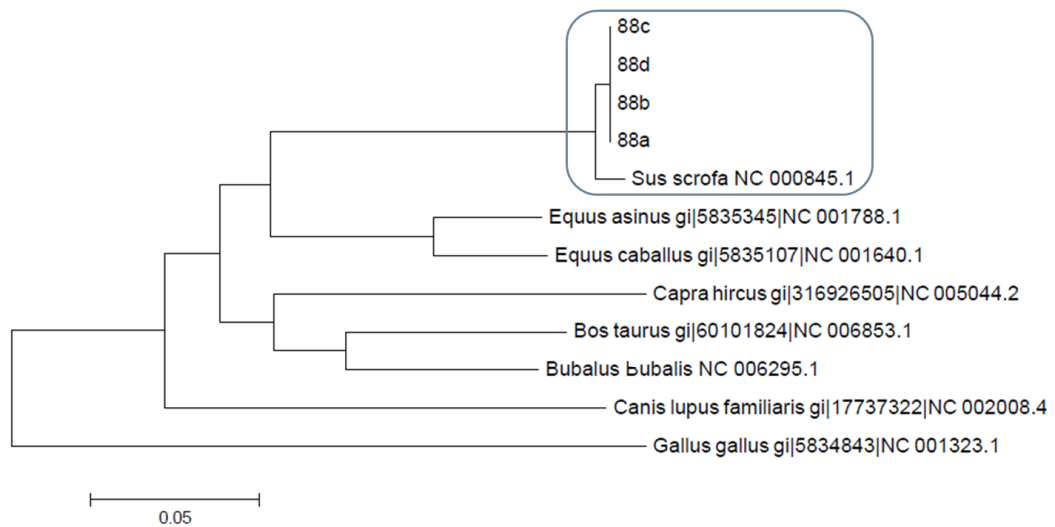


Figura 7. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 88.

En la Fig. 8 se observa el agrupamiento entre los 4 clones de la muestra 207 y la secuencia de *S. scrofa*.

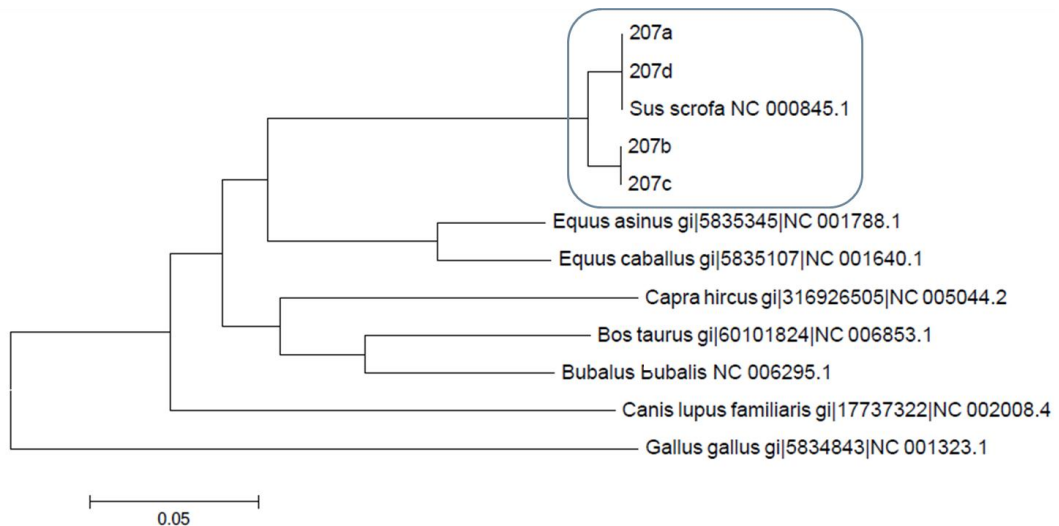


Figura 8. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 207.

En el caso de las muestras 80 (pichón), 90 (carne molida), 140, 159 (hamburguesas), 185 (empanada) y 192 (tamal), se encontró una mezcla entre carne de res y carne de cerdo.

En la Fig. 9 se observa el agrupamiento de dos clones de la muestra 80 con *Bos taurus* y dos con *Sus scrofa*.

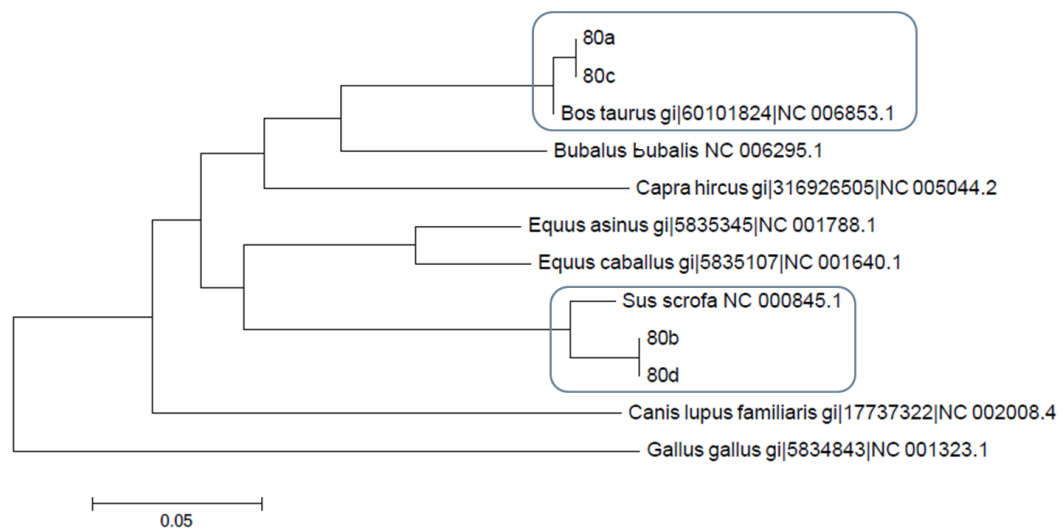


Figura 9. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 80.

En la Fig. 10 se observa el agrupamiento de dos clones de la muestra 90 con *Bos taurus* y dos con *Sus scrofa*.

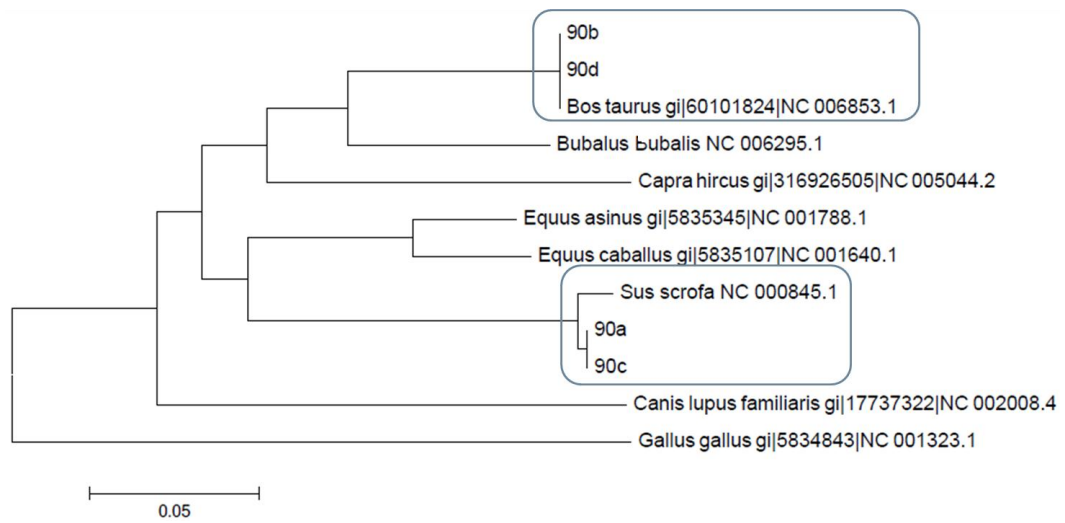


Figura 10. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 90.

En la Fig. 11 se observa el agrupamiento de tres clones de la muestra 140 con *Bos taurus* y uno con *Sus scrofa*.

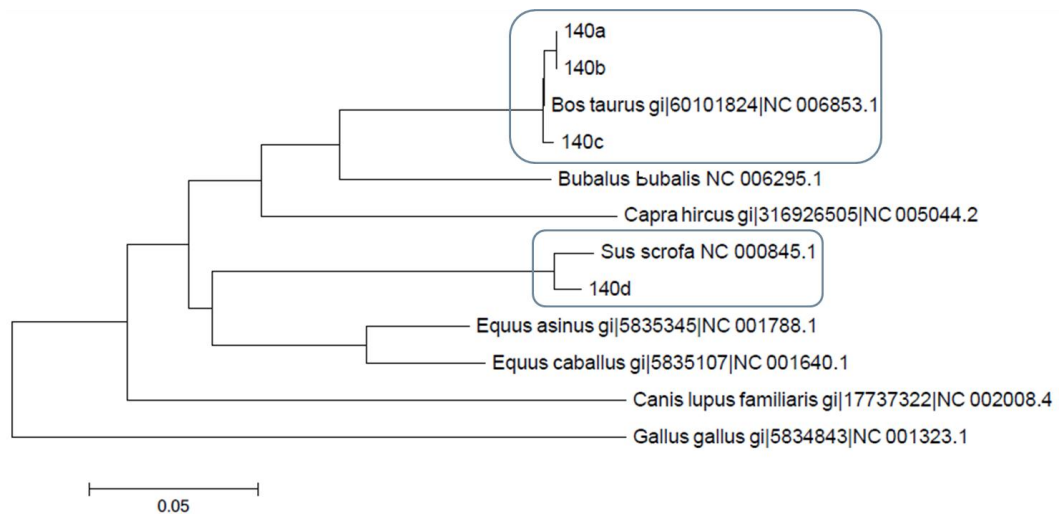


Figura 11. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 140.

En la Fig. 12 se evidencia el agrupamiento entre dos clones de la muestra 185 con *S. scrofa* y un clon con *B. taurus*.

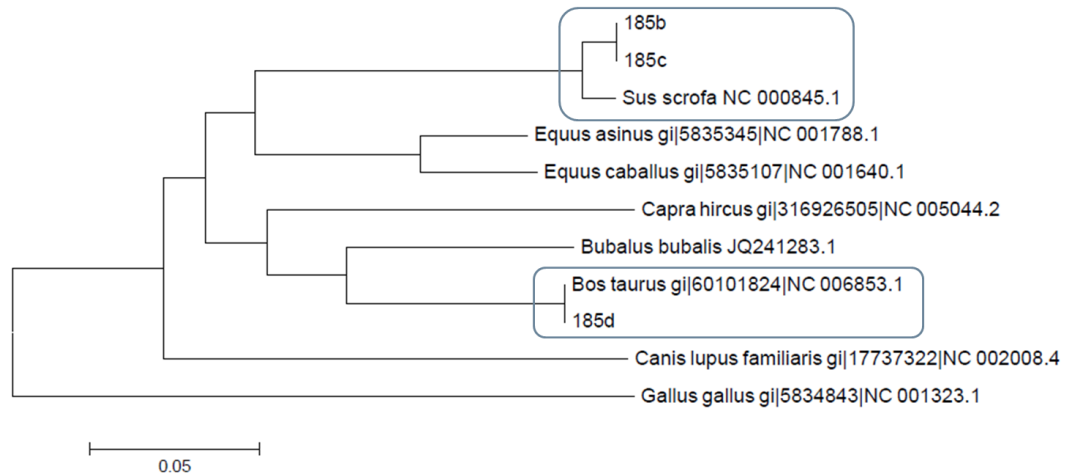


Figura 12. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 185.

En la Fig. 13 puede apreciarse la presencia de dos clones de la muestra 192 que se agrupan con la secuencia de *B. taurus* y dos con *S. scrofa*.

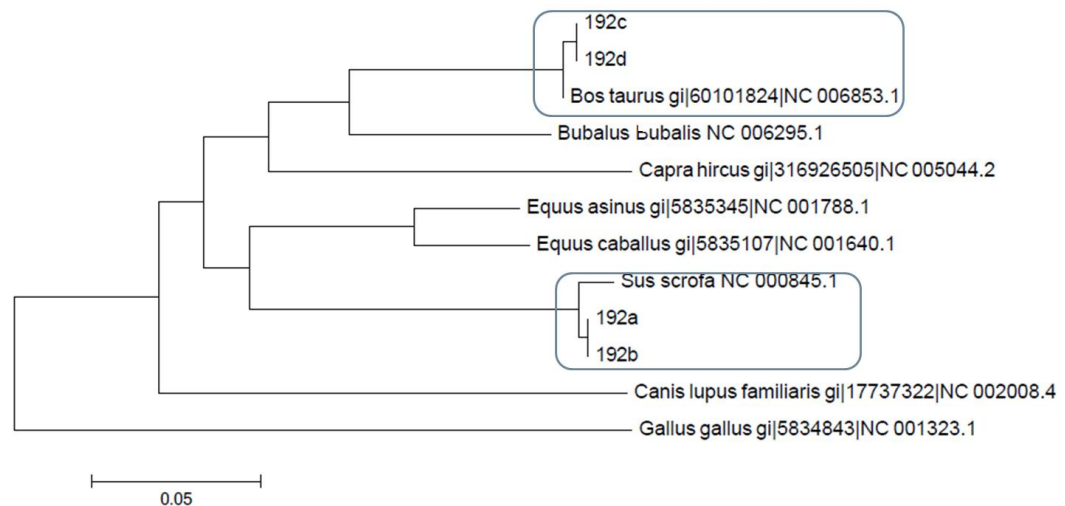


Figura 13. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 192.

Las muestras 138 y 159 reportaban en su etiqueta contener además de carne de res, carne de cerdo. En ambas muestras se encontraron las dos especies reportadas (Fig. 14 y 15), pero en el caso de la muestra 138 se encontró además *Bubalus bubalis* (Fig. 15).

En la Fig. 14 se observa el agrupamiento de dos clones de la muestra 159 con la secuencia de *B. taurus* y dos con *S. scrofa*.

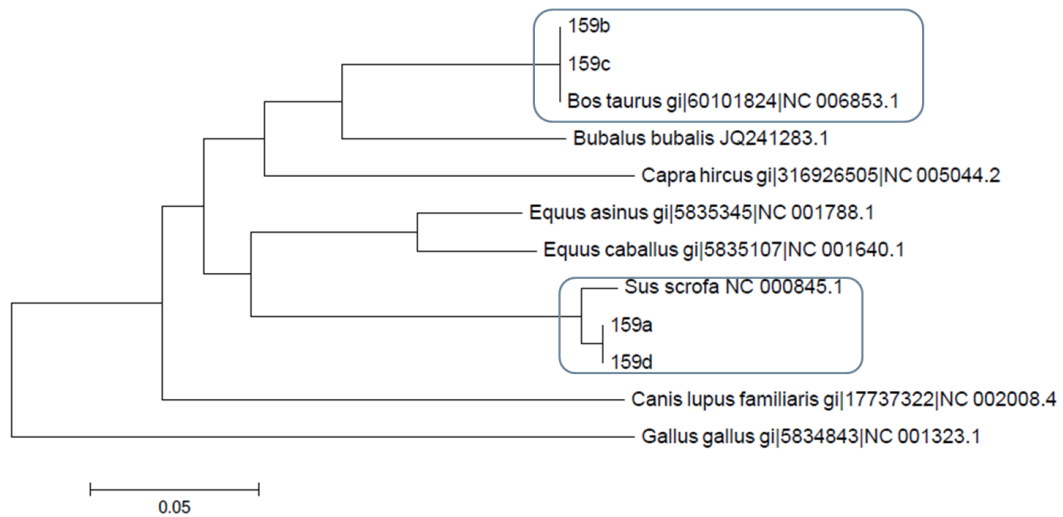


Figura 14. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 159.

En la Fig. 15 se observa la presencia de dos clones de la muestra 138 que se agrupan con la secuencia de *B. taurus*, uno con *Bubalus bubalis* y uno con *S. scrofa*.

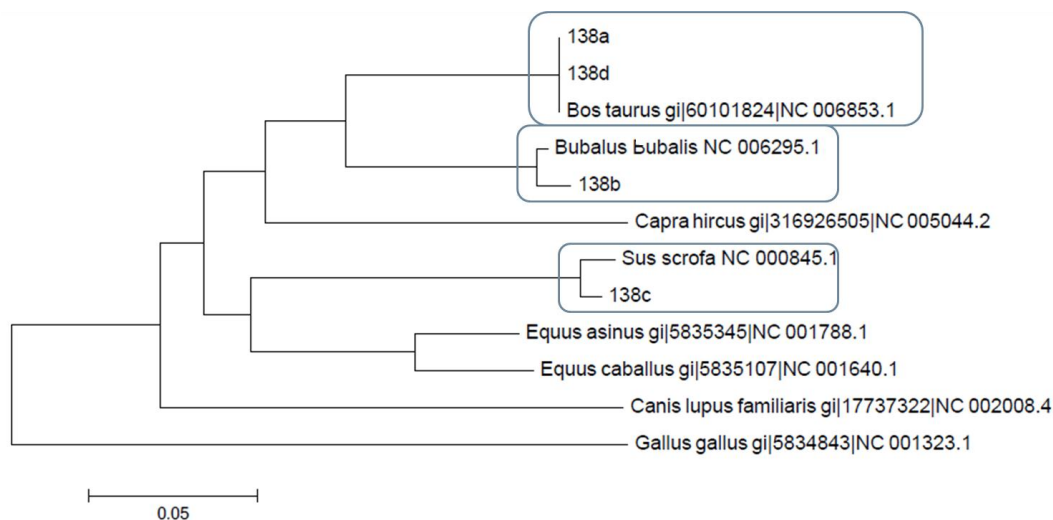


Figura 15. Árbol de distancia Neighbor-Joining (NJ) inferido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei entre secuencias de *Cyt b* para la muestra 138.

En el caso de las muestras: 30 (clones c y d), 42 (clones a y d), 185 (clon a) y 251 (clon d), los valores de distancia fueron mayores que los admitidos para identificación. Fue necesario hacer búsquedas con BlastN⁶⁴ en el genoma completo de *B. taurus*. Se identificaron estas muestras como pseudogenes en los cromosomas X y 2 de *B. taurus* (Tabla 1). Se realizó una traducción de estas secuencias con la aplicación en línea *Insilico*⁶⁹ y se hallaron cambios en el marco de lectura, así como también sustituciones aminoacídicas (Fig. 16).

Como puede verse en la figura 16, la secuencia parcial mitocondrial del gen *Cyt b* de la muestra 148c (parte superior), el marco de lectura es continuo (sombreado en celeste). A diferencia del caso de la muestra 185a (parte inferior) en la cual se observa la secuencia parcial nuclear (pseudogen) del gen *Cyt b*, donde se aprecia el cambio de marco de lectura en la secuencia (sombreado celeste y amarillo), además de sustituciones aminoacídicas (sombreadas en fucsia).

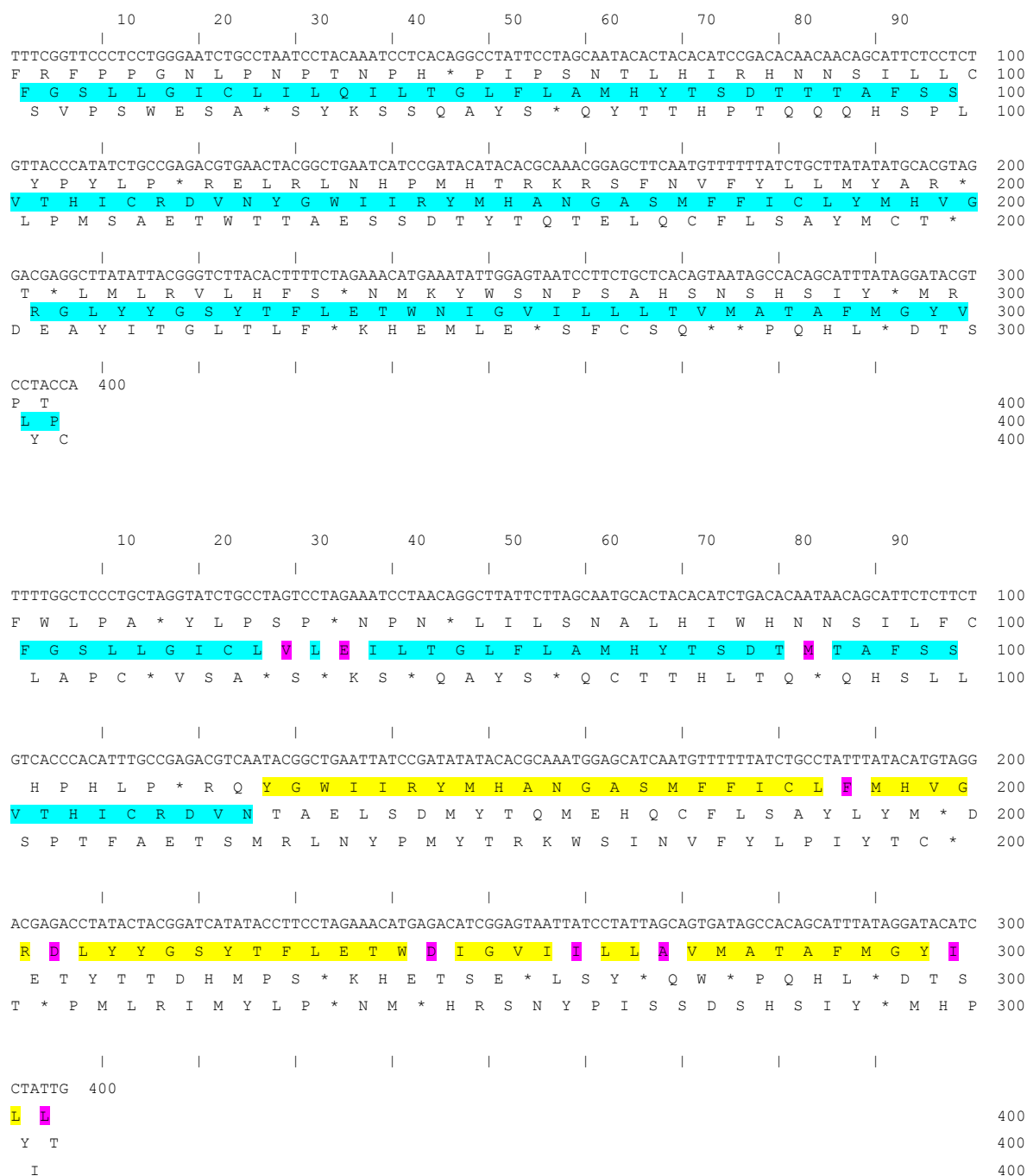


Figura 16. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del gen *Cyt b* normal en el clon 148c (superior) y pseudogen en el clon 185a (inferior).

Adicionalmente, se compararon patrones de restricción de estos clones (datos no mostrados) generados mediante la aplicación SeqBuilder del paquete DNASTAR (Lasergene, Madison, USA). Obviamente los mapas evidenciaron diferencias en los sitios de restricción además de la ausencia del sitio de corte para la enzima XbaI en el caso de los pseudogenes. Debido a la presencia de secuencias de pseudogenes en los datos, para realizar los análisis bioinformáticos se tuvieron en cuenta 173 de las 179 secuencias obtenidas, además de 11 secuencias de referencia (Anexo 1).

3. DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó la identificación de 50 muestras de productos cárnicos, de origen presuntamente bovino, de producción y expendio en Bucaramanga y su Área Metropolitana. En el 26% de las muestras de carne, se encontró sustitución de carne de cerdo por carne de res. En muestras de cárnicos vendidos bajo una marca registrada, se observó en varios casos que aunque se comercializan como carne de res, también contienen carne de cerdo.

En el caso de la muestra 138 la etiqueta reportaba contener carne de res y de cerdo. Sin embargo, nuestros análisis demuestran que también contenía búfalo (*Bubalus bubalis*). Como la carne de este último es de mayor valor comercial, es de suponer que podría tratarse de una infiltración fraudulenta de este espécimen, a fin de no desperdiciar su carne. En cualquier caso, no se está cumpliendo la norma como lo establece la *Codex Alimentarius Commission*⁷⁰.

En los árboles de distancia realizados para las muestras en las que se encontró sustitución de carne, puede observarse los agrupamientos generados entre los clones de cada muestra y las secuencias de referencia, siendo principalmente el agrupamiento entre las muestras y *Sus scrofa*.

En 4 muestras de cárnicos se encontraron 6 secuencias de pseudogenes; esto puede deberse a la utilización de los oligonucleótidos universales sugeridos por Kocher et al.⁶⁰. Debido a la baja especificidad de estos cebadores, es normal que se puedan amplificar copias nucleares del mismo gen⁷¹. Los pseudogenes ostentan características particulares como alteraciones en el marco de lectura, que los convierte en infuncionales (Fig. 16), y sustituciones aminoacídicas que conllevan a diferencias en los patrones de restricción respecto al gen mitocondrial

normal⁷². De acuerdo con esto, se hace evidente que las metodologías de identificación de carne bovina basadas en PCR-RFLP no son las más adecuadas con este tipo de oligonucleótidos. Este inconveniente podría evitarse implementando la metodología propuesta por Burgener & Hübner⁷², en la cual el aislamiento de DNA se realiza con los detergentes Triton X-100 y Nonident-P40, los cuales solubilizan todas las membranas celulares exceptuando la membrana nuclear. Por lo anterior, las muestras 30c, 30d, 42a, 42d, 185a y 251d, fueron excluidas de los análisis bioinformáticos utilizados para la identificación de las especies biológicas presentes en las muestras.

En resumen, este diagnóstico revela que las carnes bovinas que se expenden en Bucaramanga son en general genuinas. No obstante, se detectó fraude en los embutidos que contienen carne de cerdo, sin mencionarlo en las etiquetas. Finalmente, la presencia esporádica de carnes más costosas en los embutidos, podría corresponder al empleo de animales muertos por razones diferentes al sacrificio en los mataderos.

4. CONCLUSIONES

En Bucaramanga y su Área Metropolitana se presenta sustitución de carne de res por carne de cerdo o la mezcla de ambas especies. En algunos productos cárnicos se hace referencia a la mezcla de ambas carnes, pero en pocos se reporta, haciéndole creer al consumidor que está comprando un producto a base de carne de res.

Para el caso de los productos que contienen carne de *Bubalus bubalis* es necesario que lo reporten como carne de búfalo así se trate de una especie bovina, como lo estandariza la *Codex Alimentarius Commission*⁷⁰.

La utilización de los oligonucleótidos universales propuestos por Kocher et al.⁶⁰ permiten la amplificación de pseudogenes, debido a su baja especificidad respecto a una secuencia mitocondrial de una especie particular.

BIBLIOGRAFÍA

1. La ganadería colombiana y las cadenas láctea y cárnica. Cifras de referencia, Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana PEGA 2019. Boletín FEDEGAN 2010.
2. Ciampolini R., Leveziel H., Mazzanti E., Grohs C., Cianc D. Genomic identification of the breed of an individual or its tissue. Meat Science. 2000. Vol. 54:35-40.
3. Goffaux F., China B., Dams L., Clinquart A., Daube G. Development of a genetic traceability test in pig based on single nucleotide polymorphism detection. Forensic Science International. 2005. Vol. 151:239-247.
4. Bottero M. T., Dalmaso A. Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. The Veterinary Journal. 2010. Vol. 190:34-38.
5. Rastogi G., Dharne M-S., Walujkar S., Kumar A., Patole M-S., Shouche Y. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. Meat Science. 2007. Vol. 76:666–674.
6. Fajardo V., Gonzalez I., Lopezcalleja I., Martin I., Rojas M., Garcia T., Hernandez P., Martin R. PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. Meat Science. 2007. Vol. 76:644-652.

7. Rea S., Storani G., Mascaro N., Stocchi R., Loschi A-R. Species identification in anchovy pastes from the market by PCR-RFLP technique. Food Control. 2009. Vol. 20:515–520.

8. <http://www.ellider.com.co/2011/11/13/mataderos-clandestinos-generan-perdidas-economicas-a-cofema/>

9. <http://www.vanguardia.com/historico/114522-policia-desmantelo-dos-mataderos-clandestinos>

10. <http://www.elpais.com.co/elpais/judicial/policia-cierra-cuatro-mataderos-clandestinos-en-cali>

11. <http://www.caracol.com.co/noticias/regional/advierten-sobre-mataderos-clandestinos-del-tolima/20090130/nota/755727.aspx>

12. http://www.elcolombiano.com/BancoConocimiento/C/contraloria_advierte_sobre_mataderos/contraloria_advierte_sobre_mataderos.asp

13. <http://www.elpilon.com.co/inicio/el-silencio-ante-los-mataderos-clandestinos/>

14. <http://www.vanguardia.com/historico/90415-policia-desmantela-matadero-clandestino-en-ruitoque-bajo>

15. <http://www.vanguardia.com/santander/area-metropolitana/105938-sellan-matadero-clandestino-de-ganado-en-floridablanca>

16. <http://www.vanguardia.com/historico/102215-sellan-matadero-clandestino-en-vereda-de-piedecuesta>

17. <http://www.vanguardia.com/historico/60603-la-policia-desmantelo-matadero-clandestino->

18. <http://www.vanguardia.com/historico/60535-desmantelan-matadero-clandestino-que-contaminaba-el-rio-de-oro>

19. <http://www.vanguardia.com/historico/7075-hallan-850-kilos-de-carne-de-burro-en-matadero-clandestino>

20. <http://www.vanguardia.com/historico/44786-autoridades-ponen-en-cintura-a-los-mataderos>

21. Rincón E., Navarro L. Desarrollo de un método para la identificación de carne gourmet según especie mediante amplificación y secuenciación del ADN mitocondrial. Fase I: Amplificación enzimática de ADN mitocondrial. Universidad Industrial de Santander. 2004.

22. Boore J. Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Research. 1999. Vol. 27:1767-1780.

23. Brown W. M., George M., Wilson A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Genetics. 1979. Vol. 4:1967-1971.

24. Arslan A., Ilhak O. I., Calicioglu M. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. Meat Science. 2006. Vol. 72: 326-330.

25. Rasmussen R. S., Morrissey M. T. DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. Comprehensive reviews in food science and food safety. 2008. Vol. 7:280-295.

26. Bécquer A., García M., Ríos M., Louzara C., Beltrán G., Lara C. Inmunoensayo para identificar especies animales en productos cárnicos semicocidos. Revista cubana alimentación y nutrición. 2000. Vol. 14:100-103.

27. Mayer H.K. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*. 2005. Vol. 15:595-604.
28. Berrini A., Tepedino V., Borromeo V., Secchi C. Identification of freshwater fish commercially labelled “perch” by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Food Chemistry*. 2006. Vol. 96:163-168.
29. Asensio L., González I., García T., Martín R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*. 2008. Vol. 19:1-8.
30. Rea S., Storani G., Mascaro N., Stocchi R., Loschi A. R. Species identification in anchovy pastes from the market by PCR-RFLP technique. *Food Control*. 2009. Vol. 20:515–520.
31. Ballin N. Z. Authentication of meat and meat products. *Meat Science*. 2010. Vol. 86:577–587.
32. Hsieh H-S., Chai T-j., Hwang D-F. Using the PCR–RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. *Food Control*. 2007. Vol. 18:369–374.
33. Lanzilao I., Burgalassi F., Fancelli S., Settimelli M., Fani R. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of mitochondrial cytb gene from species of dairy interest. *Journal of AOAC International*. 2005. Vol. 88:128-135.

34. Fajardo V., Gonzalez I., Rojas M., Garcia T., Martin R. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology*. 2010. Vol. 21:408-421.
35. Blanco M., Pérez-Martín R. I., Sotelo C. G. Identification of Shark Species in Seafood Products by Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. Vol. 56:9868-9874.
36. Herrero B., Madriñán M., Vieites J. M., Espiñeira M. Rapid Identification of Seaweeds in Food Products by PCR Combined with ALF-RFLP and FINS Methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. Vol. 58:11586-11592.
37. Dalvit C., De Marchi M., Dal Zotto R., Gervaso M., Meuwissen T., Cassandro M. Breed assignment test in four Italian beef cattle breeds. *Meat Science*. 2008. Vol. 80:389-395.
38. Sasazaki S., Itoh K., Arimitsu S., Imada T., Takasuga A., Nagaishi H., Takano S., Mannen H., Tsuji S. Development of breed identification markers derived from AFLP in beef cattle. *Meat Science*. 2004. Vol. 67:275-280.
39. Alves E., Castellanos C., Ovilo C., Silió L., Rodríguez C. Differentiation of the raw material of the Iberian pig meat industry based on the use of amplified fragment length polymorphism. *Meat Science*. 2002. Vol. 61:157-162.
40. Yan P., Wu X-B., Shi Y., Gu C-M., Wang R-P., Wang C-L. Identification of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome b gene. *Biological Conservation*. 2005. Vol. 121:45–51.

41. Verkaar E. L. C., Nijman I. J., Boutaga K., Lenstra J. A. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Science*. 2002. Vol. 60:365–369.
42. Chandrika M., Maimunah M., Zainon M-N., Son R. Identification of the species origin of commercially available processed food products by mitochondrial DNA analysis. *International Food Research Journal*. 2010. Vol. 17: 867-876.
43. Lavergne A., Ruiz-García M., Catzefflis F., Lacote S., Contamin H., Mercereau-Puijalon O., Lacoste V., de Thoisy B. Phylogeny and phylogeography of squirrel monkeys (genus *Saimiri*) based on cytochrome b genetic analysis. *American Journal of Primatology*. 2010. Vol. 72:242-253.
44. Esteves E. Análisis morfométrico, merístico, filogenético y filogeográfico del caballo de mar *Hippocampusreidi* (Ginsburg 1933) (*Teleostei: Sygnathidae*) de la costa nororiental de Venezuela. Instituto de Biociências de Botucatu. 2010.
45. Formas R., Nuñez J., Cuevas C. Identidad de la rana austral chilena *Eupsophuscoppingeri* (*Amphibia, Anura, Neobatrachia*): Evidencias morfológicas, cromosómicas y moleculares. *RevistaChilenadeHistoria Natural*. 2008. Vol. 81:3-20.
46. La Neve F., Civera T., Mucci N., Bottero M. Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshotminisequencing analysis. *Meat Science*. 2008. Vol. 80:216-224.
47. Herman L. Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *Journal of Dairy Research*. 2001. Vol. 68:429-436.

48. Unseld M., Beyermann B., Brandt P., and Hiesel R. Identification of the Species Origin Highly Processed Meat Products by Mitochondrial DNA Sequences. *Genome Research*. 1995. Vol. 4:241-243.
49. Chapela M., Sotelo C., Pérez R. Molecular identification of cephalopod species by FINS and PCR-RFLP of a cytochrome b gene fragment. *European Food Research and Technology*. 2003. Vol. 217:524–529.
50. Bellagamba F., Moretti V., Comincini S., Valfre F. Identification of Species in Animal Feedstuffs by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. Vol. 49:3775-3781.
51. Di Pinto A., Forte V.T., Conversano M.C., Tantillo G.M. Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control*. 2005. Vol. 16:391–394.
52. Rastogi G., Dharne M., Walujkar S., Kumar A., Patole M., Shouche Y. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *MeatScience*. 2007. Vol. 76:666–674.
53. De Pancorbo M., Ramos R., Saloña M., Sánchez P. Entomología molecular forense. *CienciaForense*. 2006. Vol. 8:107-130.
54. Prusak B., Grzybowski T., Bednarek J. Cytochrome b gene (cyt b) in analysis of anonymous biological traces and its application in veterinary diagnostics and animal conservation. *Animal Science Papers and Reports*. 2005. Vol. 23:229-236.

55. Sahajpal V., Goyal S.P. Identification of a forensic case using microscopy and forensically informative nucleotide sequencing (FINS): A case study of small Indian civet (*Viverricula indica*). *Science & Justice*. 2010. Vol. 50:94-97.
56. Calo-mata P., Sotelo C. G., Pérez-Martín R. I., Rehbein H., Hold G. L., Russell V. J., Pryde S., Quinteiro J., Rey-Méndez M., Rosa C., Santos A. T. Identification of gadoid fish species using DNA-based techniques. *European Food Research and Technology*. 2003. Vol. 217:259–264.
57. Espiñeira M., Gonzalez-Lavín N., Vieites J. M., Santaclara F. J. Development of a method for the identification of scombroid and common substitute species in seafood products by FINS. *Food Chemistry*. 2009. Vol. 117:698-704.
58. Santaclara F. J., Espiñeira M., Vieites J. M. Genetic Identification of Squids (Families *Ommastrephidae* and *Loliginidae*) by PCR–RFLP and FINS Methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007. Vol. 55: 9913-9920.
59. Santaclara F. J., Cabado A. G., Vieites J. M. Development of a method for genetic identification of four species of anchovies: *E. encrasicolus*, *E. anchoita*, *E. ringens* and *E. japonicus*. *European Food Research and Technology*. 2006. Vol. 223:609–614.
60. Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Paabo S., Villablanca F. X., Wilson A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1989. Vol. 86:6196-6200.

61. Zhou C., Yang Y., Yong AY. Minipreps in ten minutes. *Biotechniques*. 1990. Vol. 8:172-173.
62. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999. Vol. 41:95-98.
63. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990. Vol. 215:403-410.
64. Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1997. Vol. 25:3389-3402.
65. Edgar R. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004. Vol. 32:1792-1797.
66. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011.
67. Saitou N., Nei M. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987. Vol. 4: 406-25.
68. Ratnasingham S., Hebert P. Barcoding BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*. 2007. Vol. 7:355–364.

69. Bikandi J., San-Millán R., Rementeria A., Garaizar J. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. 2004. Bioinformatics. Vol. 20:798-799.
70. Codex alimentarius. Volume 2. Pesticides residues in food. Second edition. Section 2. Codex classification of foods and animal feeds. Joint FAO/WHO Food Standards Programme codex alimentarius commission. 1993.
71. Mirol P., Mascheretti S., Searle J. Multiple nuclear pseudogenes of mitochondrial cytochrome b in *Ctenomys* (Caviomorpha, Rodentia) with either great similarity to or high divergence from the true mitochondrial sequence. Heredity. 2000. Vol. 84:538-547.
72. Burgener M., Hübner P. Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis. Z Lebensm Unters Forsch A. 1998. Vol. 207:261–263.

ANEXOS

Anexo A. Secuencias de referencia usadas para la construcción de la matriz de distancia y árboles de distancia genética.

Especies de referencia	Nombre común	Códigos de acceso Genbank
<i>Bos taurus</i>	Res	gi 60101824 NC_006853.1
<i>Bos taurus</i>	Res	GU367347.1
<i>Bubalus bubalis</i>	Búfalo	JQ241283.1
<i>Sus scrofa</i>	Cerdo	NC_000845.1
<i>Sus scrofa</i>	Cerdo	DQ534707.2
<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro	gi 17737322 NC_002008.4
<i>Capra hircus</i>	Cabra	gi 316926505 NC_005044.2
<i>Equus asinus</i>	Burro	gi 5835345 NC_001788.1
<i>Equus caballus</i>	Caballo	gi 5835107 NC_001640.1
<i>Gallus gallus</i>	Gallo	gi 5834843 NC_001323.1
<i>Bos javanicus</i>	Banteng	gi 288551451 gb GU367355.1