

## CAPÍTULO 7

# IDENTIFICACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA EN ANIMALES DOMÉSTICOS

FUNDAMENTOS Y MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN EMPLEADOS PARA LA ASIGNACIÓN DE UN INDIVIDUO O UNA MUESTRA BIOLÓGICA A SU ESPECIE DE ORIGEN

*Diego Manuel Posik, Marcela Gonçalves Drummond, Lissandra Sousa Dalsecco, Danilo Alves Pimenta-Neto, Denise Aparecida Andrade de Oliveira, Guillermo Giovambattista*

### 7.1. Introducción

En los últimos veinte años, el análisis de ADN ha revolucionado la ciencia forense y se ha convertido en una herramienta de suma importancia a la hora de aplicar la ley. Por otra parte, surgieron circunstancias que han llevado a la necesidad de identificar la especie de origen a la que pertenece una muestra biológica desconocida.

Entre los motivos que llevan a la identificación de la especie a la que pertenece una muestra, se encuentran:

i) La aparición de nuevas enfermedades transmitidas por animales, como la influenza aviar y la fiebre aftosa. El caso más emblemático fue el de la aparición en Inglaterra en el año 1996 de un brote de encefalopatía espongiforme bovina (más conocida como mal de la vaca loca), en la que se vieron afectados miles de animales. Una vez confirmada la posibilidad de transmisión de estos nuevos agentes infecciosos (los priones) desde los bovinos al hombre, las legislaciones

de la Unión Europea y de los Estados Unidos prohibieron el uso de proteínas derivadas de tejidos de rumiantes para alimentar animales de consumo humano (Rastogi et al., 2007). La rápida identificación de las materias primas que forman parte de un alimento o un alimento balanceado permite el rápido control del brote de una enfermedad. (Hedlin et al., 2012).

ii) Las malas prácticas de parte de algunos productores de alimentos en las que se reemplazan materias primas de una especie de mayor valor comercial (pescados, carne, leche) por otras de menor valor, sobre todo cuando existen marcadas diferencias de precio o problemas de disponibilidad en el mercado.

Por ejemplo, a comienzos de 2013, la Unión Europea enfrentó problemas de autenticación de sus productos cárnicos bovinos, los cuales presentaban la adición de carne de caballo. Después de este descubrimiento, la FSAI (*Food Safety Authority of Ireland*), junto al Departamento de Agricultura, Alimentos y Marina de Irlanda, implementaron una investigación en toda la cadena de producción y comercialización de los productos cárnicos de origen bovino que reveló el origen polaco de productos adulterados. La identificación de productos fraudulentos se extendió en toda la Unión Europea, alcanzando países como Inglaterra y Francia (*Department of Agriculture Food and the Marine*, 2013).

Como las etiquetas no proveen suficiente garantía sobre los contenidos reales de un producto, es necesario identificar y/o autenticar los componentes de los alimentos procesados, de modo de proteger tanto a consumidores como a productores de las sustituciones ilegales o de una identificación equivocada (Teletchea et al., 2005, Rastogi et al., 2007).

iii) La preocupación por las comunidades (principalmente hebreos y musulmanes) por el consumo de productos alimenticios adulterados o contaminados con carne de cerdo que, por cuestiones religiosas, no se consideran aceptables para su consumo (Mohamad et al., 2013). Lo

mismo sucede en el hinduismo, donde la vaca es considerada un animal sagrado y el consumo de su carne es tabú, siendo por lo tanto evitado por toda la comunidad hindú (Schröder, 2003).

iv) La existencia de individuos susceptibles a determinadas proteínas de origen animal, quienes suelen ser rigurosos con la elección de las especies a la hora de elegir alimentos con el objeto de evitar las alergias alimentarias.

v) La existencia de muestras encontradas en la escena del crimen que no dan resultados para los análisis estándares de DNA o microsatélites, permite plantearse si se está ante una muestra con ADN no apto para un análisis o si en realidad el ADN no pertenece a una persona. Si hubiera restos óseos que no son identificables morfológicamente, es posible confirmar la especie de origen por medio del ADN.

vi) La identificación de restos en el campo o en posesión de un sospechoso producto de la caza furtiva y la ayuda en la resolución de casos en la lucha contra de tráfico de especies en peligro de extinción (Fajardo et al., 2010). La identificación de especie de productos también se ha utilizado ampliamente en los que ya no es posible la identificación morfológica, como madera procesada (Finkeldey et al., 2010) y partes de animales (como los que se usan en la medicina tradicional china o las aletas de tiburón), que adquieren un elevado valor comercial en el mercado internacional (Ogden et al., 2009)

vii) La identificación de restos animales no humanos o especies vegetales utilizadas para la elaboración de utensilios, alimentación, rituales, etc. encontrados en sitios arqueológicos (Tillmar et al., 2013).

El concepto de “especie” es uno de los temas más debatidos de la biología evolutiva, hecho que se ve reflejado en la existencia de más de 20 definiciones basadas en diferentes métodos y criterios. La dificultad de asignar un organismo a una categoría biológicamente significativa debe ser considerada antes de usar cualquier herramienta de identificación molecular. Es importante el conocimiento de la historia evolutiva y la posición taxonómica del espécimen en estudio. Términos

como *cepa*, *variante*, *subespecie* o *raza* podrían, en algunas circunstancias, ser usados como sinónimos por diferentes investigadores para describir la misma entidad biológica (Pereira et al., 2008).

La identificación genética de especies se basa en el aislamiento y análisis de los marcadores de ADN que presentan variaciones entre especies pero son generalmente conservados dentro de la especie, ya que su tasa de mutación coincide aproximadamente con la tasa de evolución de las especies.

En animales, los marcadores más comúnmente usados son las regiones génicas dentro del ADNmt. El genoma mitocondrial, comparado con el genoma nuclear, es relativamente pequeño (en humanos 16.569 pb de ADN circular doble cadena). A diferencia del ADN nuclear, que consta de un set diploide por núcleo, existen por célula cientos a miles de copias del ADNmt. Esta abundancia permite hacer extracciones de ADN a partir de muestras altamente degradadas, procesadas o con relativamente muy poco material celular, muy comunes en genética forense animal, minimizando el riesgo de fallas al analizar este tipo de evidencia (Karlsson et al., 2007). Los haplotipos mitocondriales resultan de gran utilidad en la identificación de especies ya que no sufren recombinación y se heredan de forma uniparental. El resultado de esto es una diversidad intraespecífica reducida dado que las especies están aisladas reproductivamente y por lo tanto hacen que el ADNmt sea de utilidad para la identificación de especies. La tasa de mutación relativamente elevada, en comparación con los genes nucleares, resulta en la acumulación de mutaciones puntuales suficientes para la discriminación entre especies estrechamente relacionadas (Lockley y Bardsley, 2000). Para el gene COI, por ejemplo, la tasa de evolución molecular permite distinguir no sólo especies próximas sino también grupos filogeográficos dentro de una misma especie (Hebert et al., 2004; Hogg e Hebert, 2004; Ward et al., 2005).

Para los animales, se utiliza, en particular, el citocromo b (*Cytb*) (Parson et al., 2000; Bottero y Dalmasso, 2010; Dooley et al., 2004;

Sevillia *et al.*, 2007), la citocromo oxidasa I (COI) y la región control mitocondrial (D-loop) (Hebert *et al.*, 2003a y b). También se han usado marcadores mitocondriales adicionales que incluyen los genes que codifican para los ARN ribosomales (ARNr). Del mismo modo, se utilizan marcadores apropiados para plantas, normalmente localizados en el genoma de los cloroplastos, dentro de los genes *matK*, *rbcl* y *trnH-psbA* (Ogden *et al.*, 2009, ver capítulo 9).

El gen COI ha sido elegido para ser usado como código de barras en animales (Hebert *et al.*, 2003a) y las bases moleculares de secuencias de estas regiones están creciendo continuamente gracias al apoyo de museos de historia natural, investigadores de vida silvestre y otras instituciones, principalmente las relacionadas al consorcio CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*). El proyecto CBOL fue lanzado en mayo de 2004 y ya cuenta con más de 120 organizaciones de 45 países. CBOL tiene como objetivo promover o desarrollar alianzas internacionales de investigación necesarias para construir, a lo largo de los próximos 20 años, una biblioteca de códigos de barras para todas las especies eucarióticas (Ratnasingham e Hebert, 2007). La idea surgió en 2003, cuando investigadores de la Universidad de Guelph (Ontario, Canadá) propusieron la creación de un sistema diagnóstico universal de especies, basado en un fragmento de aproximadamente 650 pares de bases (pb), a partir de la base 58 del extremo 5' del gene mitocondrial COI. Este sistema fue denominado *DNA Barcode*, porque las secuencias de ADN de ese gen funcionarían como un código de barras (Hebert *et al.*, 2003). Posteriormente, se creó un banco genético de *DNA Barcode* para el depósito de la información de todas las especies que posean secuencias de COI publicadas, así como también especies que más tarde tendrán sus secuencias estudiadas. Para el análisis y el depósito de tales secuencias se utilizan muestras depositadas en museos u otras instituciones que previamente fueron identificadas por los taxonomistas (Ratnasingham e Hebert, 2007). Este banco de datos, denominado BOLD (*Barcode of Life Database*) permite asociar otros tipos de datos a

las muestras, tales como fotos de especímenes (*voucher*), punto de colecta, número de especímenes, institución en la cual ha sido depositado, datos taxonómicos e información molecular (electroferogramas de las secuencias y primers utilizados para la amplificación y secuenciación). El *DNA Barcode* es la técnica universal de identificación genética en peces y se usa en todo mundo, con por lo menos 7.705 especies ya analizadas (Fish-Bol, 2012). Recientemente, el organismo norteamericano FDA implementó el Barcode genético para la identificación de peces y sus productos para la certificación y detección de fraudes (Yancy et al., 2008). Iniciativas semejantes ya existen en otros países.

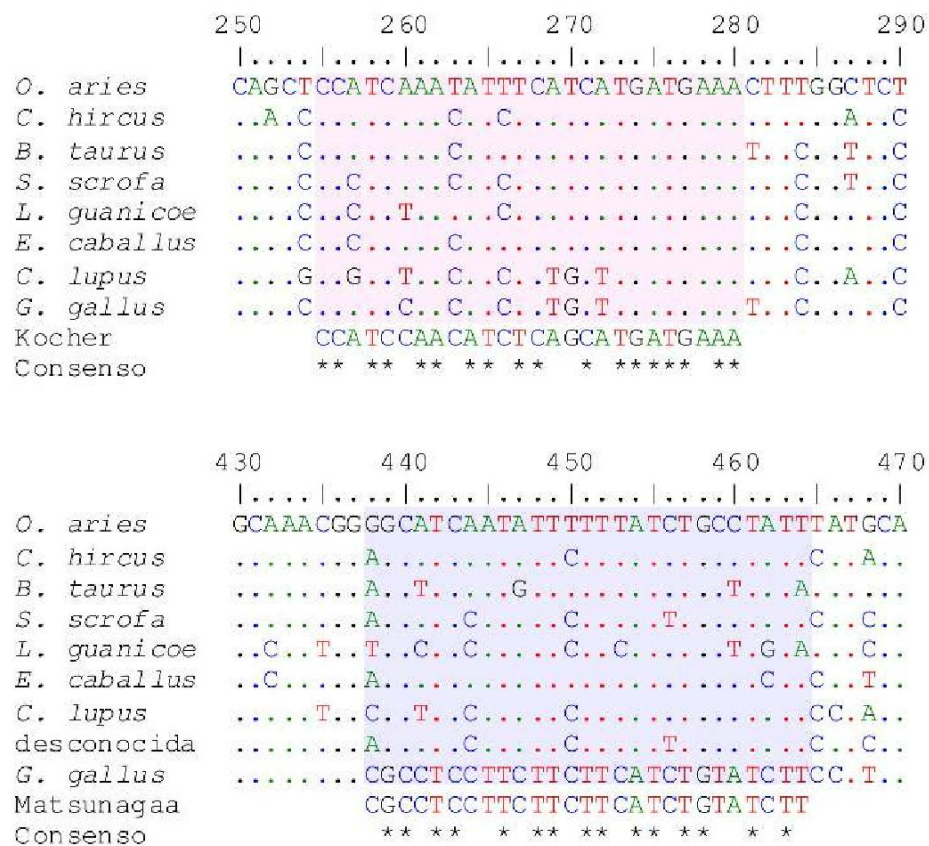
## 7.2. Identificación de especies

En la práctica existen varias técnicas que se usan para analizar marcadores informativos de especie. La mayoría de los métodos existentes para la determinación de especies se centra en muestras de ADN provenientes de una única especie y se basan en la amplificación por PCR. Sin embargo, hay muchas instancias donde no hay información *a priori* sobre las especies componentes de una muestra. En estos casos son de utilidad los métodos universales de tipificación, especialmente si el método permite detectar varias especies mezcladas en una muestra (Tillmar et al., 2013).

Uno de los principales métodos de identificación específica es la secuenciación de nucleótidos seguida de la comparación de la secuencia resultante con datos de secuencias de referencia de especies conocidas. El grado de similitud entre la secuencia a identificar y las de referencia permite inferir la especie de origen. La secuenciación de ADN ha sido aprobada por la ISFG y ha sido validada como técnica para uso en casos de identificación forense (Wilson et al., 1995).

El uso de *primers* universales, es decir *primers* que aparean en regiones altamente conservadas de un gen (regiones de secuencias que

son idénticas o prácticamente iguales entre las especies de un determinado taxón), permite amplificar el ADN de un rango amplio de especies sin contar con información previa acerca de la muestra. Estas secuencias conservadas flanquean regiones variables entre especies, lo que permite diferenciarlas por diferentes técnicas (Figura 7.1). Desde hace más de dos décadas se han descrito primers conservados como los propuestos por Kocher et al. (1989), que aún siguen siendo de utilidad en los análisis de identificación de especies.



**Figura 7.1:** Primers universales de mamífero y primers específicos de especie. La figura representa el alineamiento de dos fragmentos de la secuencia del gen citocromo b de nueve especies de animales domésticos. Los números en la parte superior corresponden a la posición de los fragmentos dentro del gen. Los puntos representan identidad de nucleótidos con respecto a la secuencia de oveja (*O. aries*)

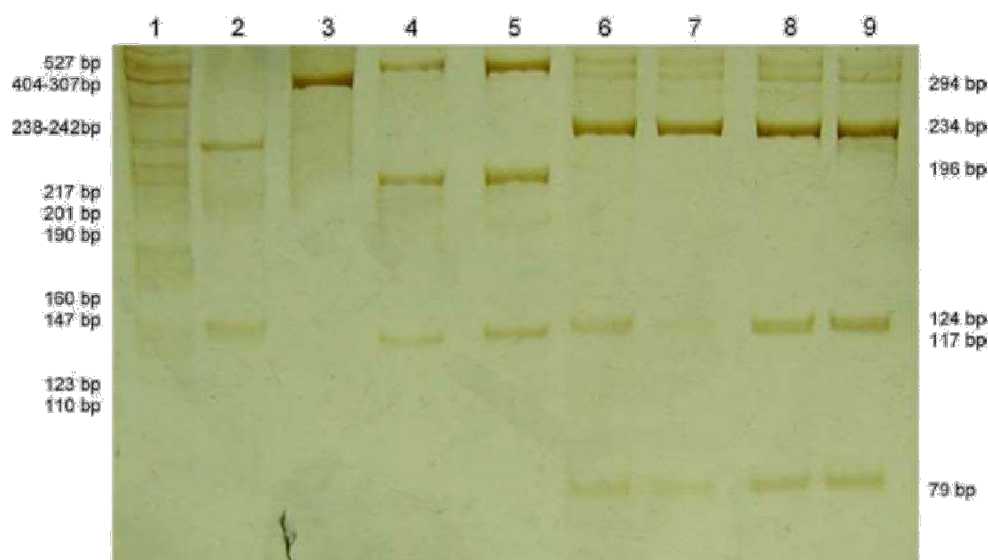
tomada como referencia. Los asteriscos representan posiciones en las que los nucleótidos están conservados en todas las secuencias analizadas. a) En el alineamiento de arriba se muestra uno de los primers universales de Kocher et al. (1989), que permite amplificar un fragmento del *cytb* de cualquiera especie de mamíferos. b) En el alineamiento de abajo se muestra uno de los primers específicos de pollo (*G. gallus*) publicado por Matsunagaa et al. (1999). Este alineamiento también contiene un fragmento de una muestra desconocida que, por comparación con el resto de las secuencias, se puede identificar como perteneciente a cerdo (*S. scrofa*).

Una vez obtenida la secuencia, el método principal de identificación del ADN es por búsqueda y comparación de la secuencia desconocida con aquellas de especies conocidas almacenadas en una base de datos de referencia. Se calcula una medida de similitud entre secuencias y la muestra es asignada a la especie más semejante. Las bases de referencia más comúnmente usadas para búsquedas comparativas de identificación de especies son las bases de colaboración del NCBI/EMBL/DDBJ ([www.insdc.org](http://www.insdc.org)) y BOLD, parte del CBOL ([www.barcodinglife.com](http://www.barcodinglife.com)). Para las especies que están bien representadas en dichas bases de datos, es común encontrar un 100% de coincidencias entre la muestra desconocida y las especies de referencia. Sin embargo, debido a las variaciones de secuencia entre especies, no siempre se observa una coincidencia completa, por lo que la identificación de la especie se logra con alrededor de un 98,5% de identidad. Especies muy relacionadas pueden tener una similitud del 90 al 95%, o incluso superior. Además, el largo de la secuencia a comparar afecta la confianza en la identificación. Es por eso, por lo tanto, que se deja en manos de la experiencia y opinión del científico forense la evaluación de la fuerza de una evidencia al abordar la tarea de asignar la especie a la que pertenece una secuencia (Ogden et al., 2009).

La secuenciación de ADN utiliza toda la información presente en la secuencia a analizar. Al realizar las comparaciones se observa que las

diferencias de marcadores genéticos a nivel de especies se deben principalmente a cambios de un único par de nucleótidos en sitios determinados de la secuencia de ADN, conocidos como SNPs (Figura 7.1).

Los SNPs pueden ser utilizados directamente para identificar especies evitando la necesidad de realizar la secuenciación completa y pueden ser caracterizados utilizando técnicas que requieren menos tecnología y/o son de menor costo, como el caso de la identificación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción amplificados por PCR (RFLP) (Bravi et al., 2004; Stamoulis et al., 2010; Figura 7.2). Los análisis por PCR-RFLP también han sido ampliamente utilizados para la identificación de especies, debido a que con un único par de iniciadores se puede generar un fragmento que, con la elección apropiada de las enzimas de restricción, permite la discriminación de varias especies (Lockley y Bardsley, 2000). La reducción del tamaño de los marcadores genéticos analizados suele ser a menudo imprescindible para obtener resultados de muestras que están degradadas o han sido altamente procesadas en las que el ADN se encuentra fragmentado (Ogden et al., 2009). En este caso es posible el análisis de regiones más cortas de ADN por medio del genotipado de SNPs por pirosecuenciación o microarrays de SNPs (Ver 7.3).



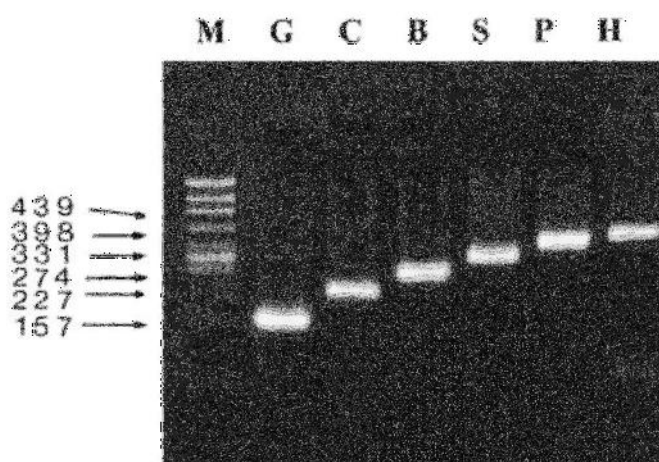
**Figura 7.2: PCR-RFLP.** Patrones de PCR-RFLP de un fragmento de amplificación por PCR del gen citocromo b (*Cytb*) obtenidos por digestión con la enzima *Hinf* I. Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: conejo. Calle 3: oveja. Calle 4: bovino. Calle 5: muestra forense de bovino. Calle 6: caballo. Calles 7 a 9: muestras forenses de caballo. Los números de la izquierda representan los tamaños del marcador de peso molecular y los de la derecha los tamaños esperados de los fragmentos de digestión (Bravi et al., 2004).

El desarrollo de ensayos dirigidos a identificar SNPs permite el análisis de muestras en las que están presentes varias especies, cosa que no es posible hacer con la secuenciación de un fragmento amplificado con primers universales.

Un enfoque diferente se orienta a las áreas de secuencias diferenciales de cada especie. El beneficio de esta estrategia reside en la posibilidad de identificar una especie individual en una mezcla de dos o más especies. Esta identificación no es posible con el uso de la secuenciación. La Figura 1b muestra cómo es posible diseñar primers que hibridan solamente en una especie y difieren especialmente en el extremo 3' del cebador. En la Figura 7.3 se observa cómo es posible amplificar por PCR seis fragmentos de diferente tamaño, cada uno perteneciente a una especie, utilizando primers específicos de especie. Esta metodología ha permitido identificar un gran número de muestras

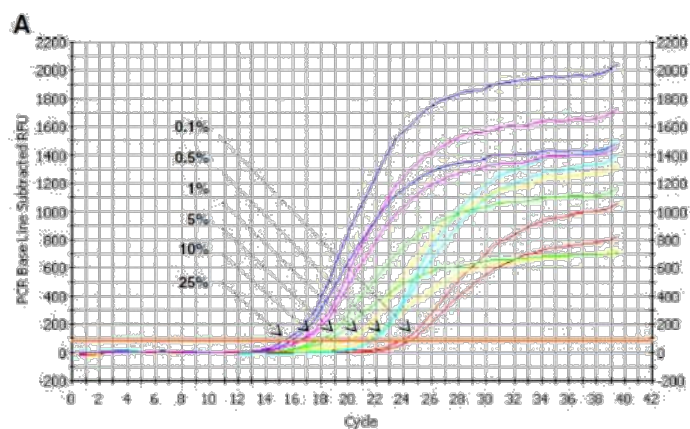
forenses de tráfico de especies, así como identificar diferentes componentes en alimentos (Matsunaga et al., 1999, Rasmussen et al., 2012, Doosti et al., 2014).

Asimismo, este tipo de diseño permite la realización de PCR múltiples (*multiplex PCR*) en las que, en una única reacción utilizando varios pares de primers, se pueden detectar simultáneamente varias especies en muestras de composición diversa (Matsunagaa et al., 1999; Tobe y Linacre, 2008).



**Figura 7.3: PCR con primers específicos de especie.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del ADN obtenido a partir de seis muestras de carne. G: cabra, C: pollo, B: bovino, S: oveja, P: cerdo y H: caballo. M: marcador de peso molecular (Matsunagaa et al., 1999).

Una alternativa al uso de primers específicos es usar primers universales en combinación con sondas específicas. Se diseñan diferentes sondas que hibridan con las secuencias de cada especie de modo que permitan ser detectadas por PCR en tiempo real ( ver Capítulo 3.5). Esta tecnología es altamente específica y sensible, permitiendo además determinar el porcentaje de ADN de cada especie presente en una mezcla (Swamgo et al., 2006; Rojas et al., 2011; Soares et al., 2013; Drummond et al., 2013).

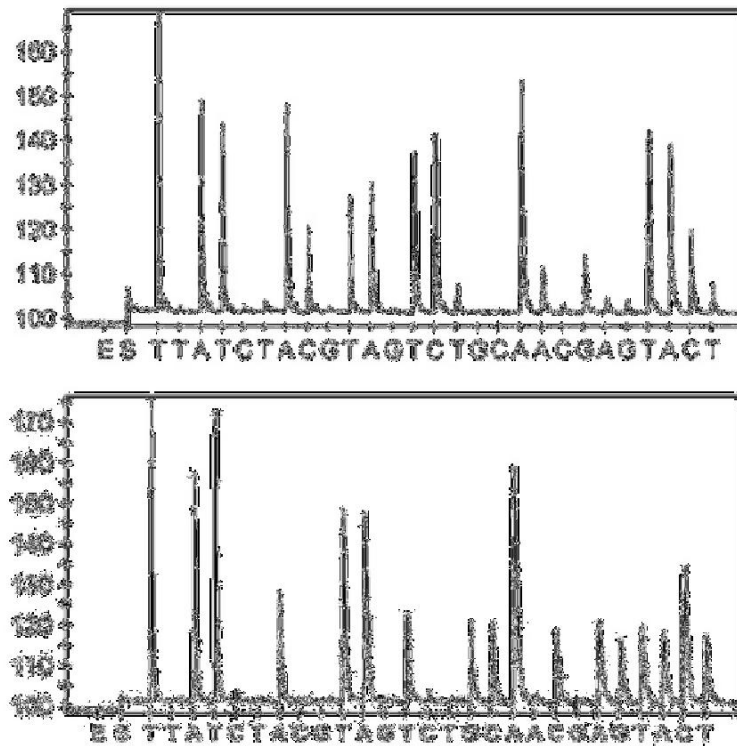


**Figura 7.4: PCR en tiempo real.** Curvas de amplificación por PCR en tiempo real de muestras de referencia de cerdo (0.1 al 25% de carne de cerdo en mezclas con carne de ave).

La identificación de SNP por pirosecuenciación permite la identificación de las posiciones variables en la secuencia de ADN entre especies distintas. Esta técnica se basa en la ocurrencia de una cascada de reacciones enzimáticas que producen la emisión de luz cada vez que se incorpora el nucleótido correcto en el extremo de una cadena de ADN que está creciendo. La incorporación de cada nucleótido se registra en un pirograma en el cual se puede leer la secuencia del ADN sintetizado. La altura de los picos de los pirogramas es proporcional al número de nucleótidos presentes en la secuencia (ver Capítulo 3.4). Focalizarse en un determinado SNP permite diseñar ensayos para la identificación de un número alto de muestras en forma rápida y económica y sin la necesidad de obtener fragmentos de ADN largos y de alta calidad (Balitzki-Korte et al., 2005; Karlsson y Holmlund, 2007).

En la Figura 7.5 se muestra cómo, por medio de la pirosecuenciación, se pueden identificar dos fragmentos pequeños de ADN obtenidos a partir de dos especies diferentes. Mediante esta técnica, Karlsson y Holmlund (2007) consiguieron identificar 28 especies de mamíferos en muestras desconocidas de fauna europea.

a)



b)

Cerdo (*Sus scrofa*) TTTAATTAACTATTCCAAAAGTTAA  
 Humano (*Homo sapiens*) -----T-T--A-G----CAG--C

**Figura 7.5: Identificación de especies por pirosecuenciación.** a) Pirogramas de cerdo (arriba) y humano (abajo) de secuencias parciales del RNAr 16S. Las secuencias correspondientes se muestran en b). (Karlsson y Holmlund, 2007).

Con las nuevas tecnologías que utilizan microarreglos, conocidos comúnmente como chips de DNA, se puede realizar la detección simultánea de un número muy alto de SNPs de las especies a analizar. Los avances tecnológicos permiten vislumbrar que estos métodos estarán disponibles en un tiempo corto para su uso en la identificación masiva de alimentos y en el tráfico de fauna (Kochzius et al., 2008).

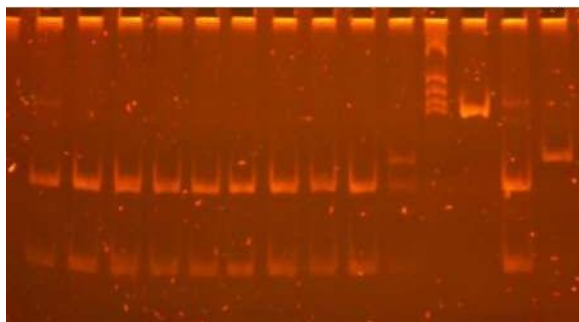
Al reducir la información genética disponible de una secuencia completa a varios SNPs dentro de un marcador genético, se aumenta el riesgo de una identificación equivocada de la muestra, que debe ser

tenida en cuenta al diseñar los ensayos y al interpretar los datos forenses. Tanto la PCR-RFLP como la identificación de SNP son métodos ampliamente aceptados en la comunidad forense; sin embargo, más que en la *identificación* de especies, son utilizados en la *detección* de las mismas.

La identificación de SNPs tiene un alcance definido por el total de especies analizadas durante el desarrollo de la técnica. La aplicación de este test asume el conocimiento de potenciales especies presentes con el objeto de distinguirlas, lo que no excluye la posibilidad de que se encuentre presente alguna otra especie distinta a la que se estaba buscando (Ogden et al., 2009).

### **7.3. Reporte de un caso**

En el año 2012 se decomisaron 10 muestras de chorizos en diferentes comercios de una localidad de la Patagonia argentina. Las muestras se enviaron al IGEVET (UNLP-CONICET LA PLATA) con la solicitud de que se les realizara un análisis de identificación de especie. A partir del ADN de dichas muestras, utilizando primers universales, se amplificaron por PCR fragmentos de 358 pb correspondientes a una región del gen mitocondrial *cytb* (Kocher et al., 1989). Los fragmentos fueron digeridos con la enzima de restricción *Hinf* I. Una de las muestras dio como resultado que en su composición había ADN de vaca y de caballo (Figura 7.6).



**Figura 7.6: PCR-RFLP de muestras de chorizo decomisadas.**

Electroforesis de los fragmentos del gen *cytb* de 358 pb amplificados por PCR y posteriormente digeridos con la enzima *Hinf* I. La digestión en bovinos genera dos fragmentos, uno de 196 pb y otro de 117 pb (calles 1 a 9, 13). En cerdos, este fragmento no posee sitio de corte para esta enzima (calle 12). En caballos, la digestión produce tres fragmentos, uno de 234 pb y otros dos de 79 y 45 pb, respectivamente (estos últimos no visibles en el gel) (calle 14). La muestra de la calle 10 muestra un patrón combinado de vaca y caballo.

Un nuevo envío de la misma entidad en 2013 constaba de 4 muestras: un trozo de carne, carne molida, un chorizo y un segundo trozo de carne, todos comercializados como de carne de vaca. Al realizar las amplificaciones con primers específicos, se pudo demostrar que los dos trozos de carne eran de caballo, la carne molida era de bovino y el chorizo era mezcla de carne de caballo y de vaca, no comprobándose la presencia de ADN de cerdo.

En la industria de los alimentos balanceados para bovinos es común utilizar la harina de pluma, subproducto de la industria avícola, como suplemento proteico. A la hora de exportar, el importador solicitaba la certificación de que la harina de pluma estuviera libre de materias primas de rumiantes (como por ejemplo, harina de hueso) con el objeto de evitar la transmisión de la encefalopatía espongiforme bovina. Un análisis de ADN de la harina de plumas demostró que en su composición había únicamente ADN de pollo.

La duda sobre el origen de un pequeño hueso encontrado dentro de una morcilla que podría haber pertenecido a un roedor fue disipada rápidamente cuando posteriormente a un tratamiento de descalcificación

se extrajo ADN del tejido y se pudo comprobar que su secuencia tenía un 99% de similitud con la secuencia del gen *Cytb* de *Sus scrofa* (cerdo) (Figura 7.7).

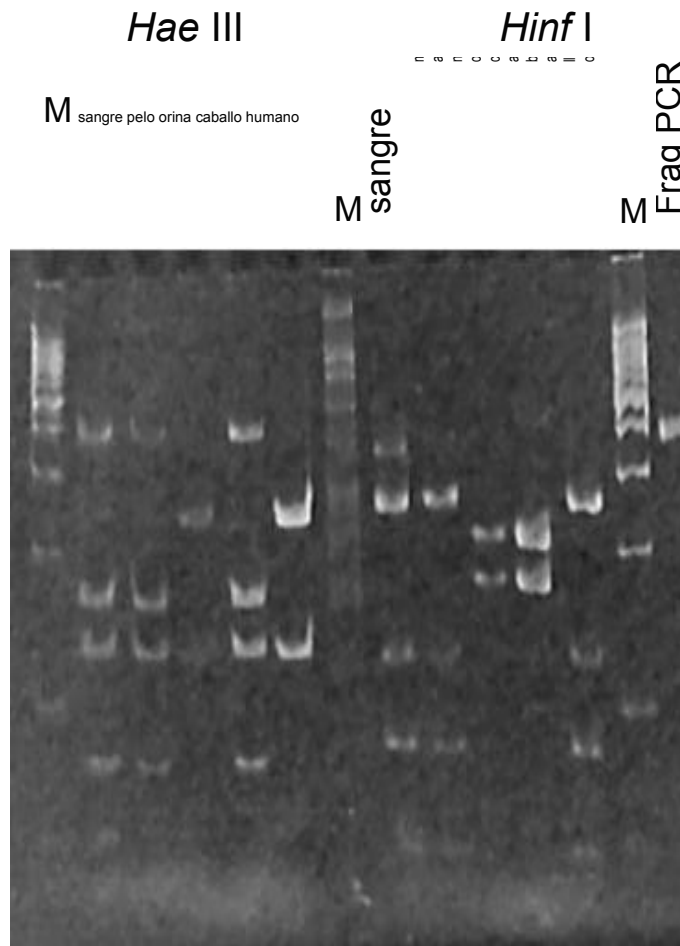


**Figura 7.7: Hueso encontrado dentro de una morcilla.** El tamaño y la forma del mismo generó la sospecha que perteneciera a alguna especie desconocida. El análisis de ADN por secuenciación demostró que provenía de un cerdo.

En una carrera de caballos, el dopaje en la orina dio positivo. El dueño afirmaba que la orina había sido sustituida ya que estaba seguro de que su caballo no había recibido ninguna droga no permitida. Con el objeto de determinar si la orina cuestionada pertenecía o no al caballo, se tomaron muestras de sangre y pelo del caballo y se les realizó la extracción de ADN para determinar la identidad por medio de microsatélites y compararlos con los que se obtendrían de la orina. Utilizando esta técnica se pudieron determinar los microsatélites de la sangre y el pelo, pero la orina dio resultados negativos.

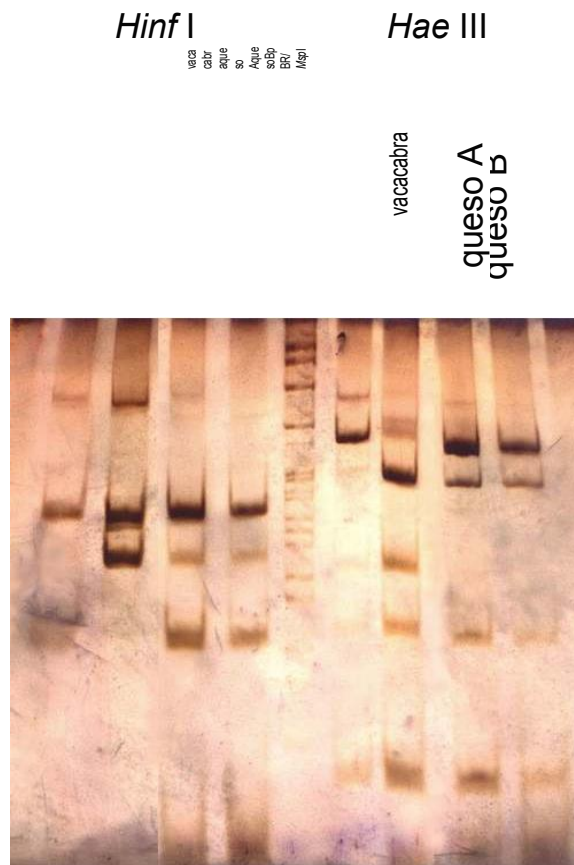
Al tratar de determinar si a partir de la orina se había podido obtener ADN con cierta integridad y libre de inhibidores, se probó sobre esta muestra la amplificación de un fragmento del gen mitocondrial *Cytb*. Se pudo obtener un producto de amplificación que al ser analizado posteriormente por secuenciación y por PCR-RFLP dio como resultado que no pertenecía a la especie equina. La comparación con el banco de datos GenBank dio un 100% de identidad con humano. Se obtuvo el

mismo resultado por la comparación de los patrones de digestión de la PCR-RFLP. Los resultados evidenciaron una manipulación de la muestra, en la que se sustituyó la orina de caballo por la de una persona, dando soporte a la hipótesis del criador del caballo sospechado de dopaje (Díaz et al., 2008; Figura 7.8).



**Figura 7.8: Patrón de PCR-RFLP de la orina de caballo sospechada de doping.** A la izquierda, patrón de digestión con la enzima *Hae* III de las muestras de sangre y pelo del caballo cuestionado, de la orina y de controles de caballo y humano. El patrón de restricción de la orina coincide con el de humano. A la derecha se muestra el patrón de restricción con la enzima *Hinf* I de las mismas muestras. Aquí también, el patrón de la orina coincide con el de humano. M: marcador de peso molecular. FragPCR: fragmento de amplificación por PCR sin digerir.

La posible sustitución de un producto por otro de menor valor comercial y la sensibilidad a las proteínas de la leche de vaca motivaron el pedido de identificación de especie a la que pertenecía la leche con que se elaboró un queso comercializado como puro de cabra. El producto generó una fuerte reacción en un consumidor alérgico quien demandó al fabricante por adulterar el producto. Al tratar de identificar la especie con la que fue elaborado se encontró que la digestión del fragmento del gen mitocondrial *cytb* con dos enzimas de restricción mostró patrones coincidentes con aquellos producto de la combinación de los patrones de vaca y cabra, confirmándose la adulteración del queso.



**Figura 7.9: Patrón de PCR-RFLP de un queso cuestionado por adulteración.** A la izquierda, patrón de digestión con la enzima *Hinf* I de controles de vaca, cabra y de dos extracciones diferentes del queso cuestionado. A la derecha, patrón de digestión con la enzima *Hae* III de las mismas muestras. En ambos casos se ve en el queso la superposición de patrones de cabra y vaca.

Durante los años 2009 y 2010 se realizó una investigación utilizando *DNA Barcode* para certificar la autenticidad de pescados comercializados como surubí en supermercados de la ciudad de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil). De acuerdo con el banco de datos *Fish Base* ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)), algunas especies, entre ellas *Pseudoplatystoma corruscans*, pueden ser comercializadas con el nombre común de surubí. La muestra estaba dividida en dos grupos, 30 muestras de peces enteros y 33 muestras de filetes. En el grupo de pescado entero, el 97% de las muestras fueron identificadas como *Pseudoplatystoma tigrinum*, una especie del mismo género, pero se encuentra en otra cuenca nacional y no es considerada como surubí por la *Fish Base*. Por el contrario, sólo el 42% de las muestras de filetes pertenecía al género *Pseudoplatystoma*. Además, presentaban una mayor similitud con otros géneros, entre ellos *Brachyplatystoma*, *Netuma* y *Genidens*. No se encontró ninguna muestra de *Pseudoplatystoma corruscans*, o surubí verdadero (Carvalho et al., 2011).

#### **7.4. Referencias Bibliográficas**

- Balitzki-Korte B.; Anslinger K.; Bartsch C; Rolf B. (2005). Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12S rRNA gene. *Int J Legal Med* 119: 291-294.
- Bottero MT., Dalmasso A. (2010). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *Vet J.*, 190, 34-38.
- Carvalho, D.C.C., Pimenta-Neto, D.A., Brasil, B.S.A.F. & Oliveira, D.A.A., 2011. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22(Suppl 1), pp 97-105.

Díaz S., Kienast E., Villegas-Castagnasso E., Pena N., Manganare M., Posik D., Peral-García P., Giovambattista G. (2008) Substitution of Human for Horse Urine Disproves an Accusation of Doping. *J Forensic Sci*, Vol. 53, No. 5.

Department of Agriculture Food and the Marine, 2013. Equine DNA & Mislabelling of Processed Beef Investigation - Report March, 2013.

Doosti A., Ghasemi Dehkordi P., Rahimi E. (2014) Molecular assay to fraud identification of meat products. *J Food Sci Technol*. 51(1):148-52. doi: 10.1007/s13197-011-0456-3.

Drummond, M.G., Brasil, B.S.A.F., Dalsecco, L.S., Brasil, R.S.A.F., Teixeira L.V., Oliveira, D.A.A., 2013. A Versatile Real-Time PCR Method to Quantify Bovine Contamination in Buffalo Products. *Food Control*, 29, pp.131–137.

Dooley JJ, Paine KE, Garrett SD, Brown HM. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68, 431–438.

Karlsson A. y Holmlund G. (2007) Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. *Forensic Science International*. 173:16– 20.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug; 86(16):6196-200.

Fajardo V, González I, Rojas M, García T, Martín R. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology*, 2010,21:408-42.

Finkeldey R, Leinemann L, Gailing O. Molecular genetics tools to infer the origin of forest plants and wood. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 Feb;85(5):1251-8.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003a) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 270(Suppl 1):96–99.

Hebert PDN, Cywinska A Ball SL and deWaard JR (2003b) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R. Soc Lond Ser B Biol Sci* 270:313–321

Hebert, P.D.N.; Penton, E. H.; Burns, J. M.; et al. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. n.101, p. 14812-14817.

Hedlin P, Taschuk R, Potter A, Griebel P, Napper S. Detection and control of prion diseases in food animals. *ISRN Vet Sci*. 2012 Feb 29; 2012:254739. doi:10.5402/2012/254739.

Hogg, ID; Hebert, PDN. (2004) Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can J Zool*. v.82, p.749-754.

Karlsson A., Holmlund G. (2007). Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. *Forensic Science International* 173:16–20.

Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: methods and protocols. *Methods Mol Bio*. 2012;858:3-8.

Lockley A., Bardsley R. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends Food Sci. Technol.*, v.11, 67–77.

Matsunagaa T., Chikuni K., Tanabeb R., Muroyab S., Shibata K., Yamadaa J., Shinmuraa Y. (1999) A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science* 51:143-148

Mohamad NA., El Sheikha AF., Mustafa S, Khairil Mokhtar NF. (2013) Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Research International* 50:330–338.

Ogden R, Dawnay N, McEwing R. (2009) Wildlife DNA forensics-bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Research*. 9:179-195.

- Pereira F, Carneiro J, Amorim A. (2008) Identification of Species with DNA-Based Technology: Current Progress and Challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 2:187-200.
- Rasmussen Hellberg RS, Morrissey MT, Hanner RH. (2010) A multiplex PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) in North America. *J Food Sci.* 75(7):C595-606.
- Rastogi G., Dharne M, Walujkar S., Kumar A., Patole M, Shouche Y. (2007) Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science* 76:666–674.
- Ratnasingham, S.; Hebert, P. D. N. BOLD: The barcode of life data system [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, n. 7, p. 355–364, 2007.
- Rojas M., González I., Pavón MA., Pegels N., Hernández PE., García T, Martín R. (2011). Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market. *Food Control* 22: 523-531.
- Sevilla RG., Diez A., Noren ., Mouchel., Jerome M., Verrez-Bagnis V., Van Pelt H., Favre Krey L., Krey G., Bautista J. (2007). Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes*. 7(5):730-734.
- Soares S., Amaral JS., Oliveira MB., Mafra I. (2013) A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science* 94:115–120.
- Stamoulis P., Stamatis C., Sarafidou T., Mamuris Z. (2010) Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. *Food Control* 21:1061–1065.
- Swango K., Timken M., Chong MD., Buoncristiani MR. (2006) A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic Science International* 158:14–26.

Tillmar AO, Dell'Amico B, Welander J, Holmlund G (2013) A Universal Method for Species Identification of Mammals Utilizing Next Generation Sequencing for the Analysis of DNA Mixtures. *PLoS ONE* 8(12): e83761. doi:10.1371/journal.pone. 0083761.

Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; et al. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, v. 360(1462): 1847-1857.

Wilson MR, Dizinno JA, Polanskey D, Replogle J, Budowle B. (1995) Validation of mitochondrial-DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med* 108:68–74.

Yancy, H.F.; Zemlak, T.S.; Mason, J.A.; et al. Potential use of DNA barcodes in regulatory science: applications of the regulatory fish encyclopedia. *J Food Prot.* v.71, p.210-217, 2008.