



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

“ IMPLEMENTACIÓN Y VERIFICACIÓN DE UN SISTEMA DE
TRAZABILIDAD MOLECULAR PARA CARNE DE BOVINO DE
EXPORTACIÓN ”

Por:

CHRISTIAN GÓMEZ PINEDA

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito para parcial para obtener el grado de

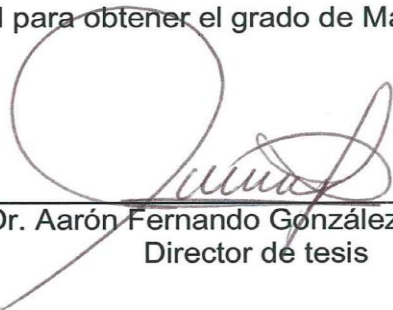
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora.

Enero de 2015

APROBACIÓN


Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Christian Gómez Pineda lo han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias



Dr. Aarón Fernando González Córdova
Director de tesis



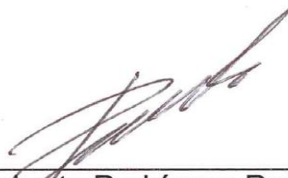
Dra. Belinda Vallejo Galland
Asesor



Dr. Humberto González Ríos.
Asesor



Dr. Juan Pedro Camou Arriola
Asesor



Dr. Roberto Rodríguez Ramírez
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

CONACYT por el apoyo prestado durante el posgrado.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por permitirme realizar mi formación como Maestro en Ciencias.

Coordinación de Tecnologías de Alimentos de Origen Animal.

A mi Director de tesis, **Dr. Aarón Fernando González Córdova** que me dio todo su apoyo, también por su gran paciencia y dedicación que hizo de esta maestría una gran experiencia.

A los miembros del comité de tesis: **Dra. Belinda Vallejo Galland, Dr. Humberto González Ríos, Dr. Juan Pedro Camou Arriola** y al **Dr. Roberto Rodríguez Ramírez** por su apoyo en el desarrollo y culminación de todo el presente estudio.

Al **Dr. Adrian Hernández Mendoza** por la revisión y el asesoramiento para la culminación de este escrito de tesis. A la **M.C. Carmen Estrada** y al **M.C. Ricardo Reyes** por toda su incondicional ayuda.

A la **MVZ. Guadalupe Martínez**, el **MVZ. Santiago Fernández**, el **MVZ. Uhry Lajud**, la **MVZ. Guadalupe Villalobos**, al **MVZ. Roberto Zambrano Loustaunau** y **Rancho El 17, S.A. de C.V.**, al **Lic. Mario Contreras** y **Frigorífica Contreras S.A. de C.V.** y a **Procesadora y Empacadora Ganadera de Sonora, S.A. de C.V.**, **Barbara Fransway** y a **University of Arizona Genetics Core** por todas las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

A **Daniel Wicochea, Isidro Méndez, Eleazar Aguilar, Alejandra Arana, Luisana Guirado, Fausto Cantú, Lilia Beltrán, Aline Reyes, Karmina Álvares, Olga Lidia, Trinidad López, Sinaí Ojeda, Lourdes Santiago y Alejandro Santos** y compañeros de laboratorio y generación por ser parte de esta gran aventura.

A **Leoán y Hérygo Gómez Pineda** y sus hermosas familias por ser mi ejemplo de vida.

DEDICATORIA

A mis padres Piedad
Pineda Gómez y Heriberto
Gómez Gurrión por todo su
amor, guía y apoyo
absoluto.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 La Trazabilidad como Control Sanitario.....	1
2.2 Sistemas de Trazabilidad en el Proceso de la Carne Utilizando Identificaciones Individuales Biométricas y no Biométricas.....	6
3. IDENTIFICACIÓN E INSPECCIÓN DE LOS ANIMALES Y SUS PRODUCTOS EN LOS ESTABLECIMIENTOS TIF.....	6
3.1 En el Establecimiento de Sacrificio.....	8
3.2 En los Establecimientos de Corte y Deshuese	12
3.3 En los Puntos de Venta al Público.....	15
4. IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS A TRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES.....	1
4.1 PCR Punto Final.....	1
4.1.1 Pasos que Constituyen la PCR.....	18
4.2 RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	5
4.3 SNP's (Single Nucleotide Polymorphism).....	6
4.4 SSR o STR's o Microsatélites (Simple Sequence Repeat o Short Tandem Repeat).....	6
5. MICROSATÉLITES COMO MARCADORES	1
5.1 Evaluación del Poder de Discriminación de los Microsatélites	4
5.2 Secuenciación de Fragmentos de ADN por Electroforesis Capilar.....	8
6. HIPÓTESIS	1
7. OBJETIVOS	1

CONTENIDO (Continuación...)

7.1 Objetivo General.....	37
7.2 Objetivos Específicos.....	1
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	1
8.1 Selección de los Establecimientos Tipo Inspección Federal (TIF).....	1
8.2 Obtención de las Muestras.....	39
8.3 Extracción, Purificación y Análisis del ADN.....	40
8.3.1 Protocolo de Extracción y Purificación del ADN de Sangre.....	40
8.3.2 Protocolo de Extracción y Purificación del ADN de Músculo.....	42
8.4 Concentración y Pureza del ADN Extraído.....	6
8.5 Verificación de la Integridad del ADN por Gel de Electroforesis.....	44
8.6 Amplificación de Gen Constitutivo Correspondiente a <i>Bos taurus</i> por PCR Punto Final.....	44
8.7 Amplificación de 11 Microsatélites por PCR Punto Final.....	47
8.8 Uso de Fluorocromos para el Análisis de Fragmentos de ADN por Electroforesis Capilar.....	50
8.9 Secuenciación de Productos de PCR por Electroforesis Capilar.....	50
8.10 Análisis Estadístico.....	53
8.10.1 Determinación de Número y Frecuencias Alélicas.....	55
8.10.2 Polimorfismo.....	55
8.10.3 El Contenido de Información Polimórfica.....	55
8.10.4 Determinación de la Heterocigosidad.....	56
8.10.5 Heterocigosidad Observada	56
8.10.6 Determinación de la Probabilidad de Correspondencia.....	57

CONTENIDO (Continuación...)

9. IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA DE TRAZABILIDAD MOLECULAR EN DOS ESTABLECIMIENTOS TIPO INSPECCIÓN FEDERAL (TIF) DE CORTE Y DESHUESE Y UNO DE SACRIFICIO.....	58
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
10.1 Extracción y Purificación de ADN.....	60
10.2 Integridad de ADN por Gel de Electroforesis.....	60
10.3 Amplificación de un Gen Constitutivo Correspondiente a <i>Bos taurus</i> por PCR Punto Final.....	65
10.4 Purificación de muestras por ensayo PicoGreen™.....	65
10.5 Amplificación de 11 Microsatélites por PCR Punto Final.....	65
10.6 Secuenciación de Productos de PCR por Electroforesis Capilar.....	67
10.7 Determinación de Número y Frecuencias Alélicas Contenido de Información Polimórfica (PIC) y Heterocigocidad.....	69
10.8 Determinación de la Probabilidad de Correspondencia y Capacidad de Exclusión.....	78
11. VERIFICACIÓN DEL SISTEMA DE TRAZABILIDAD IMPLEMENTADO....	82
12. CONCLUSIONES.....	85
13. REFERENCIAS.....	86

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Ejemplos de métodos de rastreo en la cadena productiva.....	9
Tabla 2.- Reactivos necesarios para llevar a cabo la técnica de PCR.....	19
Tabla 3.- Características de muestreo y almacenaje de diferentes muestras biológicas.....	3
Tabla 4.- Secuencias de cebadores y condiciones de PCR punto final para la amplificación del gen constitutivo correspondiente a <i>Bos taurus</i>	8
Tabla 5.- Microsatélites de bovino seleccionados para el estudio de las razas sintéticas mexicanas	10
Tabla 6.- Tiempos y temperaturas de amplificación de microsatélites por PCR punto final.....	49
Tabla 7.- Espectro de emisión, intensidad relativa, coloración y STR al que corresponden los fluoróforos utilizados en este estudio.....	51
Tabla 8.- Rango de concentraciones y valores de pureza de ADN para las muestras colectadas de Empresa A.....	27
Tabla 9.- Rango de concentraciones y valores de pureza de ADN para las muestras colectadas de Empresa B.....	64
Tabla 10.- Pares de bases (bp) y alelos (homocigotos y heterocigotos) detectados por fluorescencia para las muestras colectadas de Empresa A.....	74
Tabla 11.- Pares de bases (bp) y alelos (homocigotos y heterocigotos) detectados por fluorescencia para las muestras colectadas de Empresa B.....	75

LISTA DE TABLAS (Continuación...)

Tabla 12.- Frecuencias alélicas, PIC, PIC medio, He y He media para la raza Charolais de la Empresa A.....76

Tabla 13.- Frecuencias alélicas, PIC, PIC medio, He y He media para las razas sintéticas de la Empresa B.....77

Tabla 14.- Probabilidad de Correspondencia (MP) para la raza Charolais de la Empresa A.....80

Tabla 15.- Probabilidad de Correspondencia (MP) para las razas sintéticas de la Empresa B.....81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Comparación costo – complejidad del rastreo de ADN en los tres pasos más importantes de la cadena de producción de la carne.....	25
Figura 2.- Formación de una raza sintética multirracial derivada de cuatro razas puras.....	31
Figura 3.- Secuencia fluorescente por electroforesis capilar.....	34
Figura 4.- Implementación de muestreo para la trazabilidad molecular en la cadena productiva.....	41
Figura 5.- Espectro de emisión de los fluorocromos utilizados en el estudio	52
Figura 6.- Variación de la concentración de ADN a diferentes tiempos de incubación en solución de lisis nucléica y proteinasa K.....	61
Figura 7.- Confirmación de la integridad de ADN analizado por gel de electroforesis.....	62
Figura 8.- Electroforesis en Gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación del gen constitutivo correspondiente a <i>Bos taurus</i> (271 pb).....	66
Figura 9.- Electroferogramas de correspondencia de microsatélites en análisis de fragmentos por electroforesis capilar de muestras de Empresa A.....	70
Figura 10.- Electroferogramas de correspondencia de microsatélites en análisis de fragmentos por electroforesis capilar de muestras de Empresa B.....	71
Figura 11.- Electroferogramas donde no existe correspondencia de un mismo individuo comparando peso en pb por electroforesis capilar de muestras de Empresa B.....	73

RESUMEN

La trazabilidad en los productos de origen animal ha adquirido una notable importancia como medida de seguridad a partir de las crisis alimentarias de mediados de los noventa, con los brotes de enfermedades como la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), fiebre aftosa, scrapie en ovinos y fiebre porcina clásica, entre otras. Estas crisis, además de otros aspectos para asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos, llevaron a los países a desarrollar regulaciones y medidas de control de riesgos a la salud humana, más estrictos. La trazabilidad es un conjunto de medidas, acciones técnicas y procedimientos que permiten la identificación y el registro de un producto desde su origen hasta el final de la cadena comercial. El objetivo de este trabajo fue el de implementar y verificar un sistema de trazabilidad, basado en el análisis de ADN utilizando microsatélites, para aplicarse en la cadena de producción de carne desde la planta de sacrificio hasta los puntos de venta. La información resultante del análisis de 11 microsatélites por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis capilar de 30 muestras de sangre y 30 de músculo, confirmaron y verificaron que el 91 y 86 % de los animales muestreados para la empresa A y para la empresa B respectivamente, correspondieron con sus contrapartes obtenidas en plantas de proceso y puntos de venta. La probabilidad de correspondencia para las muestras analizadas de la empresa A fue de 2.97×10^{-10} %, mientras que para la empresa B fue de 1.74×10^{-12} %. La capacidad de exclusión calculada fue de 99.99 % para ambas empresas, confirmándose que el sistema de trazabilidad implementado en la presente investigación, se relacionó con los registros de trazabilidad convencional proporcionados por las empresas en las que fueron realizados los muestreos.

Palabras clave: Trazabilidad molecular, PCR, electroforesis capilar, microsatélites.

ABSTRACT

The traceability of animal products has acquired considerable importance as a safety measure as from the food crisis of the mid -nineties, with outbreaks of diseases such as bovine spongiform encephalopathy (BSE), foot and mouth disease, Scrapie in sheep and classical swine fever, among others. These crises, in addition to other aspects to ensure the quality and food safety, led countries to develop stricter regulations and measures to control risks to human health. Traceability is a set of measures, technical measures and procedures for the identification and registration of a product from its origin to the end of the commercial chain. The aim of this study was to implement and verify a traceability system based on DNA analysis using microsatellites to be applied in the production of meat from slaughter plant to the point of sale. The information resulting from analysis of 11 microsatellite through Polymerase chain reaction (PCR) and capillary electrophoresis of 30 blood and 30 muscle samples, confirmed and verified that 91 and 86 % of the animals sampled for the company A and B respectively, corresponded with their counterparts obtained in processing plants and retail outlets. The Match Probability for the Company A samples was 2.97×10^{-10} %, while for Company B was 1.74×10^{-12} %. The calculated exclusion capacity was 99.99 % for both companies, confirming that the traceability system implemented in the present investigation was related to conventional traceability records provided by the companies in which the samples were performed.

Keywords: Molecular traceability, PCR, capillary electrophoresis, microsatellites.

I. INTRODUCCIÓN

El actual y constante incremento en el intercambio de bienes de origen animal, las experiencias de los años 90's con enfermedades como Encefalopatía Espongiforme Bovina o EEB, Scrapie, Fiebre Aftosa, Fiebre Porcina Clásica o FPC (Felmer, 2006; Pettitt, 2001) entre otras enfermedades que se salieron del control sanitario y afectaron la salud humana. Los requerimientos para detectar hormonas, esteroides, antibióticos, pesticidas y residuos tóxicos, así como la presencia de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados por microorganismos patógenos (ETA's) (Felmer, 2006) y el riesgo de ataques bioterroristas en EUA y la Unión Europea, han creado la necesidad de asegurar la calidad e inocuidad de los productos de origen animal a nivel mundial.

Por lo anterior, los gobiernos de los países más desarrollados económicamente, han establecido nuevas regulaciones y medidas de control para asegurar el riesgo a la salud humana y por ende la confianza por parte del consumidor (Council of the European Communities, 2000). Para lograrlo, han implementado políticas para la identificación individual y rastreo de los animales y sus productos a través de la aplicación de sistemas de trazabilidad.

Algunos de los métodos de trazabilidad clásicos, como lo son los aretes o crotales, acompañados de su registro y documentación dentro del sistema, no son suficientes para dar seguimiento a la ubicación de los productos y subproductos de origen animal debido a que pueden ser removidos o alterados durante el sacrificio y despiece de los animales (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2010). Para evitar la pérdida de la trazabilidad, en varios países se han

desarrollado métodos capaces de verificar el seguimiento de la carne hasta el punto de venta. Uno de estos métodos de verificación es la denominada trazabilidad genética o molecular, basada en marcadores moleculares de ADN específicos (Schwägele, 2005).

Aunque en la actualidad existen diferentes marcadores moleculares disponibles, como los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o RFLP's (por sus siglas en inglés) y los polimorfismos de nucleótidos simples o SNP's, los más utilizados para la trazabilidad de la carne de bovino son los microsatélites (Felmer, 2008).

El presente estudio, consideró el panel de 11 microsatélites recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG, por sus siglas en inglés) para las razas sintéticas mexicanas ya que proporcionan la mayor información para la discriminación genética entre animales (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2010).

El uso de PCR punto final y electroforesis capilar para amplificar y secuenciar microsatélites específicos para las razas sintéticas bovinas de México pueden ser herramientas precisas y confiables de verificación de la trazabilidad, que le permitirán al gobierno mexicano controlar la ubicación de animales, productos y subproductos de origen animal que pudiesen representar un peligro a la seguridad nacional en materia de salud animal e inocuidad alimentaria.

El propósito de la presente investigación es implementar un sistema de trazabilidad molecular confiable, que garantice la ubicación de la carne con fines de exportación durante toda su cadena productiva hasta llegar al consumidor.

II. ANTECEDENTES

2.1 La Trazabilidad como Control Sanitario

A través de los últimos cincuenta años, los investigadores han considerado la trazabilidad como una herramienta de control de calidad en los sistemas de producción de bienes de origen animal, debido a que las principales características de estos sistemas, (como flujo de producción continua, lotes de producción y la producción personalizada -o por encargo-), definen la unidad básica de la trazabilidad dentro de la producción, siendo la identificación en el flujo, la identificación del lote y/o de un solo producto a través de la fecha o número de serie, la manera más común de llevarse a cabo (De Mello, 2000).

Los sistemas de trazabilidad pueden tener diferentes niveles de complejidad técnicos, desde los más sencillos hasta los más detallados y estos van a depender de los requisitos de control de calidad impuestos y del propio proceso de los productos cárnicos.

Los factores más importantes en la determinación de un nivel específico de complejidad del sistema de trazabilidad al momento de implementarlo, pueden agruparse en dos, aquellos asociados con los costos de implementación y operación del sistema, y los relacionados con el alcance de su aplicación, o nivel de cobertura en una cadena productiva.

De Mello (2000), definió que "El sistema de trazabilidad, utilizando o no la tecnología de la información, permite el seguimiento de información de diferentes tipos (en relación con el proceso de producción, producto y/o servicio) hacia adelante y/o hacia atrás desde cualquiera de las etapas de la cadena de producción o de un departamento de la empresa". Así pues, al traspolar esta definición al sector pecuario Mexicano, la complejidad en la implementación, operación y alcance estarán en función de las estrategias del Gobierno Federal a través de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y su entorno institucional y competitivo.

A partir de las experiencias adquiridas en los últimos veinte años en el sector ganadero mundial, las distintas crisis relacionadas con la ingesta de alimentos contaminados y la diseminación de enfermedades que impactan directamente en la salud animal y humana (antropozoonosis y zoonosis), se han podido investigar, determinar, controlar, y en algunos casos erradicar algunas enfermedades fatales para el hombre y con alto grado de patogenicidad, mortandad y diseminación para los animales (Serra y Godoy, 2000).

La presencia de *E. coli* entero-hemorrágica cepa O157:H7 en EUA en 1982 (Sofos, 2008) y la reciente pandemia de Influenza H1N1 (mal denominada Influenza porcina), evidenciaron la necesidad de establecer procedimientos de identificación y seguimiento individual de cada uno de los animales que son destinados al consumo humano, es por esto que la trazabilidad es una herramienta que, cuando se implementa de manera eficiente, confiable, específica e inalterable, garantiza la ubicación de la carne durante la cadena productiva y funciona como control sanitario.

Así mismo, la presencia de residuos tóxicos en los productos cárnicos, tales como antibióticos, pesticidas, hormonas y agentes anabolizantes, han generado en los consumidores una alarma sanitaria debido a la gran facilidad de diseminación de estos químicos y a la complejidad de establecer sistemas

de control y/o prevención. La población en la actualidad espera y demanda obtener productos inocuos y de calidad.

Algunas de estas enfermedades como “El mal de las vacas locas” o Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), la encefalopatía espongiforme ovina (scrapie por su nombre en inglés) y la Fiebre Aftosa (FA), entre otros, derivaron en una despoblación de animales artiodáctilos en Europa y Suramérica (Council of the European Communities, 2000). La Fiebre Porcina Clásica (FPC), recientemente la epidemia de influenza aviar de alta patogenicidad H1N1 que se tradujo en la mayor crisis de desconfianza registrada en la historia de la industria cárnica en el mundo (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2010), así como el surgimiento de nuevas enfermedades como la Diarrea Epidémica Porcina (DEP) de origen viral, que actualmente afecta el hato porcino de nuestro país (SENASICA – CPA Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales, 2014) son un claro ejemplo de la importancia del rastreo de los animales y sus productos alrededor del mundo y de la afectación económica que conllevan a cada país.

En el entorno nacional, en nuestro país a partir del 2013, la inocuidad alimentaria, pasó a ser un tema de seguridad nacional y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) de la SAGARPA, es la instancia gubernamental encargada de garantizar la concordancia y homologación de los sistemas de inspección veterinaria internacionales con los que México cuenta protocolos de exportación de bienes de origen animal.

De acuerdo con información de SAGARPA del 2011, México contaba con alrededor de 1,151 rastros de distintas especies distribuidos en todo el territorio. En total, 913 (79.3%) son rastros municipales, 141 (12.3%) rastros privados y 97 (8.4%) rastros Tipo Inspección Federal (TIF).

Así mismo, el consumo *per cápita* de carne de bovino en México fue de 17 Kg. En el año 2011, el inventario nacional de ganado bovino era de aproximadamente 30,571,400 cabezas y se sacrificaron 8,758,900 cabezas con

un peso promedio de 205 kg. Se produjeron 1,799,500,000 toneladas de carne de bovino (Incluye las partidas arancelarias 02.01 Carne fresca o refrigerada, 02.02 Carne congelada, 02.06 Despojos comestibles (solo sub-partidas 02.06.10, 02.06.21, 02.06.22, y 02.06.29). Así como las sub-partidas 02.10.20 Carne y despojos salados o en salmuera y 16.02.50 Carne procesada).

En 2011 se exportaron aproximadamente 113,400,000 toneladas de carne de bovino, a la par que 251,300,000 toneladas fueron importadas (www.financierarural.gob.mx). El estado de Sonora participó con el 4.8% de las cabezas sacrificadas a nivel nacional y aproximadamente el 50% del sacrificio total de ganado bovino en este estado (aproximadamente unas 5,500 cabezas por mes), se llevó a cabo en el Rastro TIF No. 118 denominado “Procesadora y Empacadora Ganadera de Sonora, S.A. de C.V.” (SENASICA-SAGARPA, 2011).

Es debido a factores de salud pública, salud animal, epidemiológicos y por lo tanto económicos, que es imprescindible sustentar y soportar de manera científica y tecnológica la trazabilidad de la carne con herramientas de vanguardia, como marcadores moleculares, que garanticen el correcto rastreo y ubicación de los productos en todas las etapas del proceso (Arana *et al.*, 2002) .

2.2 Sistemas de Trazabilidad en el Proceso de la Carne Utilizando Identificaciones Individuales Biométricas y No Biométricas

Uno de los requisitos más importantes en la trazabilidad animal, es la implementación de un sistema de identificación animal inalterable. Existen sistemas basados en propiedades biométricas y no biométricas de los animales (Felmer *et al.*, 2006).

Los sistemas basados en autenticación biométrica se centran en la aplicación de técnicas matemáticas y estadísticas sobre los rasgos físicos para

verificar su identidad, por ejemplo las huellas dactilares, la retina, el iris y el rastreo del ADN.

Los sistemas de identificación no biométricos no se centran en las características propias del animal, éstos se generan como identificación *in situ* como tatuajes, etiquetas convencionales, aretes, chips electrónicos, bolos ruminales y transpondedores, entre otros (Caja *et al.*, 2000).

En México, la SAGARPA a partir del 2003, inició la implementación del Sistema Nacional de Identificación Individual de Ganado (SINIIGA), mismo que indica el marcaje de cada uno de los animales a través del uso de aretes colocados en la oreja del animal como identificación única del mismo a lo largo de toda su vida (www.sagarpa.gob.mx) y tiene como objetivo principal la identificación individual y permanente del ganado en México por medio de la colocación de aretes y el diseño y conformación de una base de datos (regional y nacional) que permita tomar acciones integrales para elevar los estándares sanitarios y de competitividad de la ganadería mexicana.

El sistema registra los datos del productor, de la unidad de producción pecuaria (UPP) y del animal, de igual manera quedan registrados datos como notificaciones de nacimiento, importación, ingreso o salida de un animal a una UPP y su sacrificio en el rastro (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2010).

A pesar de que México tiene implementados el SINIIGA y el Sistema TIF, de que dentro de los requisitos de la implementación de los sistemas de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP por sus siglas en inglés) en plantas exportadoras, y de que la Ley Federal de Sanidad Animal y su Reglamento (2007), contempla en su Capítulo III “De la Trazabilidad”, las bases para la implementación de sistemas de trazabilidad en animales, bienes de origen animal o productos para uso o consumo animal, hasta ahora, los mismos no garantizan la inviolabilidad, no adulteración y la no alteración de la información generada antes y durante el sacrificio, despiece y distribución de los productos cárnicos hasta el punto de venta y consumidor final (Ley Federal Sanidad Animal y su Reglamento, 2007).

Una buena alternativa para las empresas exportadoras y productoras de carne, es implementar un sistema de trazabilidad respaldado por el código basado en el ADN o huella genética para identificar al animal y sus productos, que permitiría la trazabilidad con una mayor exactitud y precisión, ya que el ADN representa el mejor y menos inviolable marcador natural a ser usado en el rastreo de productos cárnicos (Vázquez *et al.*, 2004).

III. IDENTIFICACIÓN E INSPECCIÓN DE LOS ANIMALES Y PRODUCTOS EN LOS ESTABLECIMIENTOS TIF

Para poder exportar productos cárnicos a otro país, el gobierno mexicano, o sea la SAGARPA a través del SENASICA, debe contar con un sistema de inspección veterinaria homologado con el país destino de la exportación, esto quiere decir que debe existir un protocolo de intercambio de bienes de origen animal analizado, evaluado y auditado de conformidad por ambos gobiernos para garantizar el cumplimiento del mismo (Ley Federal Sanidad Animal y su Reglamento, 2007).

El sistema de inspección veterinaria es integral y contempla toda la cadena productiva del proceso de la carne abarcando aspectos como la salud animal, la crianza, alimentación, medicina preventiva, transporte y bienestar animal, la inspección antemortem y postmortem de los animales, el proceso de industrialización y la trazabilidad, inocuidad y salud pública.

La Tabla 1, muestra algunos ejemplos de métodos de rastreo que pueden ser implementados en una cadena de producción animal.

3.1 En el Establecimiento de Sacrificio

Una vez que los animales han cumplido su etapa de alimentación en la finca o explotación pecuaria, el siguiente paso en el seguimiento y rastreo de los animales a través de la cadena productiva se lleva a cabo en el envío de los animales a sacrificio y éste se realiza mediante la elaboración de un Certificado

Zoosanitario de Movilización Nacional (CZMN), el cual contiene información necesaria para la identificación de los animales por lote como número de animales transportados, origen, destino, ubicación de la granja, marcaje o fierro de identificación, sexo, número de lote y raza de los animales (Ley Federal Sanidad Animal y su Reglamento, 2007), cabe destacar que el certificado se emite de manera electrónica, bajo el sistema informático gubernamental y que un chip adherido al documento al ser

Tabla 1. Ejemplos de métodos de rastreo en la cadena productiva

Animales vivos	Aretes visuales para oreja Identificación por Radio Frecuencia (RFID) para orejas Etiquetas con código de barras para oreja Tatuajes Inyección de anticuerpos
Sacrificio y proceso	Etiquetas con código de barras Etiquetas con Radio Frecuencias Marcas de lote Códigos de barras moleculares Puntos cuánticos Radares de microondas
Menudeo y distribución	Lectores de códigos de barras
Consumidor	Códigos numéricos (QR) Internet público y accesible

Adaptado de Yordanov y Angelova, 2006

escaneado, proporciona toda la información en los Puntos de Verificación e Inspección Fitozoosanitarios Federales y Estatales (PVI) ubicados a lo largo del territorio nacional.

El aseguramiento de la trazabilidad en el transporte de los animales es de suma importancia ya que se ubican física y espacialmente los lotes de animales, además, productivamente hablando, es durante esta etapa dónde los animales sufren un mayor estrés, golpes, hacinamiento y pérdida de peso. En este sentido, el transporte de los animales entre granjas y con destino al sacrificio, puede ser un factor decisivo en la diseminación y propagación de enfermedades a lo largo del territorio nacional.

En los PVI, el personal oficial realiza una inspección física del transporte, las características de transporte, el número de animales y lo cotejan con los documentos de embarque y si es necesario, desembarcan en corrales de inspección cuarentenaria el lote completo de animales y les realizan un examen físico en estática y dinámica a fin de verificar la salud de los mismos.

Cuando el transporte y lote de animales han sido inspeccionados en los PVI y ya han sido embarcados los animales nuevamente, los oficiales asignados a los puntos de inspección vuelven a flejar el transporte y sellan y firman el anverso del CZMN. Estas firmas y sellos son seriados entre puntos de inspección, ya que para que el oficial pueda firmar y sellar el CZMN en cuestión, el mismo debe estar firmado y sellado por el oficial del PVI anterior, de lo contrario se retiene el transporte y el lote de animales.

Una vez arribado el lote de animales al establecimiento de sacrificio, el Médico Veterinario Coadyuvante de la SAGARPA (MVRATIF) y/o el Médico Veterinario Oficial Responsable del establecimiento (MVO), verifica las condiciones del transporte, los documentos oficiales y retira el fleje que asegura el lote de animales, procediendo al desembarque de los mismos y coteja la información del CZMN con los aretes y marcas de herraje de los animales a fin de asegurar su identidad (NOM-024-ZOO-1995; NOM-051-ZOO-1995).

Cuando los animales se encuentran en los corrales de descanso, el MVO realiza la inspección en estática y dinámica de cada uno de los animales, segregando a los que presentan evidentes signos de enfermedad para un posterior examen más detallado en el corral destinado para animales sospechosos (Reglamento de la industrialización sanitaria de la carne 1952; Manual para la inspección sanitaria en establecimientos de sacrificio TIF, 2008), éste es uno de los puntos clave en la prevención y diseminación de enfermedades en la cadena productiva ya que se evita que ingresen animales enfermos o portadores de enfermedades a la línea de producción y por ende la contaminación de la línea de proceso y la posible propagación de microorganismos causantes de enfermedades hasta el consumidor final.

Ya que el MVO determinó que los animales son aptos para el sacrificio, y una vez que se ha privado de conciencia y sensibilidad al animal a través de la des-sensibilización, personal del establecimiento y personal coadyuvante de la SAGARPA retiran los aretes y marcas de identificación de los animales y vierten la información de los aretes, marcas de herraje, sexo, raza, edad, color y señas particulares en documentos oficiales para asegurar la trazabilidad hasta ese punto (Manual para la inspección sanitaria en establecimientos de sacrificio TIF, 2008), es aquí donde la trazabilidad es susceptible de ser modificada y/o alterada ya que el animal queda desprovisto de identificación confiable, si bien es cierto que se le asigna un número interno a cada animal en esta etapa, los datos de los documentos y registros, así como las mismas identificaciones individuales, pueden ser cambiadas ya sea con dolo o por falta de capacitación del personal asignado a esta labor.

Una vez que el animal ha sido noqueado e izado hasta el riel, el siguiente paso consiste en el desangrado del animal y el proceso propio de la faena (convertir a un animal en canal, desprovisto de piel, patas, manos, vísceras y cabeza), el cual involucra 100% sistemas no biométricos para la identificación como tintas y marcadores para carne, etiquetas y códigos de barras para cada uno de los subproductos.

Una vez que el animal ha sido desangrado, en el proceso de transferencia del animal de un pial (área y riel sucios) al riel automático y ganchos de acero inoxidable (área gris), y ya desprovisto de patas y manos, el animal es marcado en el músculo de la pierna (vasto lateral) con un marcador de tinta orgánica, este número es el número interno de identificación que el establecimiento le asigna durante todo el proceso de sacrificio y el número es individual por animal y por introductor.

Dentro de la línea de faenado, existen cuatro puntos de inspección oficial (Manual para la inspección sanitaria en establecimientos de sacrificio TIF, 2008), el primero es la inspección de cabezas que se encarga de identificar y separar las mismas con lesiones sugestivas a tuberculosis, cisticercosis, actinomicosis y actinobacilosis, entre otras enfermedades, se retiran las papilas linguales como material de riesgo específico (MRE o SRM por sus siglas en inglés) para la prevención de la EEB y se inciden y laminan los nódulos linfáticos mandibulares, parotídeos, retrofaríngeos mediales y laterales. Las cabezas se identifican con una etiqueta que contiene el número de animal e introductor, éste coincide con el número asignado a la canal.

El segundo punto de inspección oficial es la inspección de vísceras verdes (vísceras de la cavidad abdominal, excepto hígado) donde se retira un metro de íleon distal del intestino delgado desde la válvula ileocecal hacia caudal como MRE y se inciden y laminan todos los nódulos linfáticos mesentéricos, las vísceras verdes se identifican con el marcador de tinta orgánica y se le asigna el número interno del animal, mismo que coincide con el número de la canal.

El tercer punto es la inspección de vísceras rojas (vísceras de la cavidad torácica e hígado) donde se buscan lesiones sugestivas a tuberculosis, edema, pericarditis y parásitos como cisticercos y *Fasciola hepática*, entre otros, y se inciden y laminan todos los nódulos linfáticos traqueobronquiales, y mediastínicos, a las vísceras rojas se le adhiere una etiqueta con el número de animal e introductor con el mismo número asignado a la canal. (Reglamento de

la industrialización sanitaria de la carne 1952; Manual para la inspección sanitaria en establecimientos de sacrificio TIF, 2008).

El cuarto punto de inspección se encarga de revisar las dos mitades que conforman la canal, inspeccionando los nódulos linfáticos poplíteos, subilíacos, mamarios, iliacos mediales y cervicales superficiales (en caso de que la cabeza, vísceras verdes o rojas tengan lesiones sugestivas de enfermedad) y a la par se verifica que el punto crítico de control obligado en el sacrificio de bovinos, como es la ausencia de heces, leche e ingesta, se haya cumplido al 100 % (www.senasica.gob.mx).

A cada una de las dos partes que conforman una canal se le imprime un código de barras que contiene información del introductor o propietario de los animales, así como fecha de sacrificio, peso en caliente, sexo, edad y número de lote.

Ya identificadas las canales, se ingresan por 48 hr a cámaras de refrigeración hasta alcanzar una temperatura ≤ 4 °C. Previo al embarque de las canales, el MVO realiza una última inspección de cada una de las mismas para después ser embarcadas a las salas de corte y deshuese mediante un Aviso de movilización de productos y subproductos de origen animal, este documento detalla las fechas de sacrificio y proceso así como números de lote y el número de fleje del transporte con el fin de continuar con la trazabilidad de los productos, el mismo, se emite a través de la plataforma informática del SENASICA – SAGARPA (NOM-024-ZOO-1995).

3.2 En los Establecimientos de Corte y Deshuese

Las canales derivadas del proceso de sacrificio, se embarcan 48 hr después del faenado en transportes refrigerados y especialmente adaptados para dicha labor, los transportes pertenecen a las plantas de corte y deshuese y, antes de ser embarcadas las canales, el MVO les realiza la última inspección

visual y pesado individual, corroborando que las mismas cumplan con una temperatura ≤ 4 °C.

Cuando el transporte arriba a la planta de corte y deshuese, el MVO asignado a esa planta es el encargado de cotejar y quitar el cintillo, mismo que viene referido en el documento oficial (NOM-024-ZOO-1995). El producto se inspecciona organolépticamente canal por canal con el fin de evitar contaminaciones, sustituciones o adulteraciones y se confirma la temperatura para poder ingresar a las cámaras de conservación o directamente a proceso (NOM-009-ZOO-1994).

Las canales, al cuartearse forman piezas primarias y éstas a su vez, forman piezas secundarias las cuales se identifican con códigos de barras, las mismas indican la fecha de sacrificio, fecha de proceso, caducidad y número interno individual. A lo largo de la cadena de corte y deshuese, se generan diversas etiquetas con el fin de trazar los productos y subproductos de la pieza primaria o secundaria. Los pedidos se arman dependiendo de la presentación del producto o subproducto, ya sea para venta a granel o venta individual con o sin valor agregado, tratando de no mezclar lotes diferentes para un solo pedido. El resultado puede ser un pedido armado de un solo lote de canales o, si el producto es suntuoso y las piezas individuales son muy pequeñas, estará conformado por diferentes lotes, lo que puede llegar a dificultar la identificación individual.

El MVO responsable del establecimiento es el encargado de realizar la última inspección de los productos y subproductos que son destinados a venta directa al público y certifica con documentos oficiales la movilización hasta destino final (NOM-009-ZOO-1994; NOM-024-ZOO-1995).

3.3 En los Puntos de Venta al Público

Las tiendas de venta directa al consumidor, al no ser establecimientos Tipo Inspección Federal (TIF), no cuentan con un Médico Veterinario Oficial que realice la inspección de los productos al recibo, esta labor la realiza control de calidad de la empresa. Las piezas primarias y secundarias ingresan a las cámaras de refrigeración y congelación con el mismo código de barras que les fue asignado en la planta de corte y deshuese, según el programa de primeras entrada – primeras salidas del programa maestro de control de calidad. Al momento de ser despachado y/o cortado para la venta directa al público, se le asigna otro código de barras que refiere a la información de los códigos de barras anteriores, este es el final de la identificación durante todo el proceso de la carne, así, en cualquier momento se puede ubicar en tiempo y espacio la carne desde que se sacrifica al animal, hasta el plato del consumidor.

IV. IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS A TRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES

En la actualidad un gran número de compañías genómicas, se encuentran desarrollando sistemas basados en el rastreo de ADN. Estos sistemas de rastreo explotan naturalmente la variación del código genético, que se encuentra conformado por sólo cuatro unidades o nucleótidos (A=adenina, C=citosina, G=guanina, T=timina).

Los sistemas caen en tres tipos: el primero usa polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP's por sus siglas en inglés), el segundo utiliza polimorfismos de nucleótidos simples (SNP's por sus siglas en inglés o snips) y el tercero utiliza SSR o Simple Sequence Repeat por sus siglas en inglés o también conocidos como STR's (Short Tandem Repeat) o microsatélites (Yordanov y Angelova, 2006).

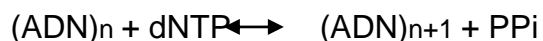
Por otro lado, la PCR es una reacción enzimática mediante la cual es posible generar *in vitro* una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN de interés (Kubista *et al.*, 2006). Con esta, se ha facilitado la identificación de especies, ya que favorece el análisis de perfiles de DNA al generar millones de copias de los fragmentos DNA que son utilizados para su identificación, lo que permite su fácil detección por técnicas electroforéticas.

4.1 PCR Punto Final

La reacción de la cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction) es una técnica *in vitro* de biología molecular que busca sintetizar ADN para obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular, partiendo de un fragmento original o molde, éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean.

La reproducción del fragmento se lleva a cabo de manera exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN termoestable de tal manera que es posible, en cuestión de horas, obtener millones de copias de la secuencia deseada del ADN. (Rodríguez y Barrera, 2004).

La técnica es altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un ADN específico, posibilitando su fácil identificación. Ésta se encuentra fundamentada en la propiedad natural de las enzimas ADN polimerasas termoestables (e.i. *Thermus aquaticus* – Polimerasa Taq) que intervienen en el proceso de replicación del ADN. Estas enzimas llevan a cabo la síntesis de la nueva cadena de ADN emparejando los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) con los desoxirribonucleótidos complementarios correspondientes del ADN molde. Los dNTP que se usan en la replicación del ADN contienen tres fosfatos unidos al grupo hidroxilo 5' de la desoxirribosa y dependiendo de la base nitrogenada serán dATP, dTTP dCTP o dGTP. La reacción fundamental es una transferencia de un grupo fosfato en la que el grupo 3'-OH actúa como un nucleófilo en el extremo 3' de la cadena que está en crecimiento. El ataque nucleofílico se produce sobre el fosfato α (el más próximo a la desoxirribosa) del desoxirribonucleósido 5' trifosfato que entra, liberándose pirofosfato inorgánico y, al formarse un nuevo enlace fosfodiéster, alargándose el ADN (Ortega y García, 2011).



La técnica de PCR se lleva a cabo en un aparato llamado termociclador que permite calentar y enfriar haciendo uso del efecto Peltier, (permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica) para controlar las temperaturas necesarias para cada etapa de la reacción. Los tubos usados en PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica y así un equilibrio térmico, la Tabla 2 muestra los reactivos necesarios para llevar a cabo la técnica de PCR.

El proceso de PCR consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos que tienen 3 pasos de temperatura. Los pasos de ciclos comúnmente están precedidos por un choque térmico (hold) a alta temperatura ($> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$) y seguido por otro "hold" al final del proceso de extensión de producto final.

4.1.1 Pasos que Constituyen la PCR

Desnaturalización.-

Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96 $^{\circ}\text{C}$ que se mantiene durante 1-9 minutos. Al calentar el ADN a 94-95 $^{\circ}\text{C}$, las dos cadenas de las cuales está constituido el ADN, se separan, a esto se le llama desnaturalización y consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. La temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción depende de la proporción de G+C que tenga la cadena, así como también, el largo de la misma, si la muestra tiene alto contenido de G+C, es recomendable aumentar el tiempo de reacción.

Alineamiento o unión de los cebadores.-

Esta reacción es termo-dependiente y se lleva a cabo a una temperatura que facilite el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADN. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión (T_m) de los iniciadores, ambos iniciadores deben tener una temperatura de

fusión T_m similar y por ende, un contenido semejante en G+C. La fórmula más utilizada para calcular la T_m de un cebador es (Barrera *et al*, 1993):

$$T_m = (2 \text{ }^\circ\text{C}) (\# \text{ de A + T}) + (4^\circ\text{C}) (\# \text{ de G + C})$$

Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada. Al bajar la temperatura a 40-68 °C (generalmente oscila entre 50 y 60 °C) durante 20-40 segundos, el primer o cebador (ADN sintético de hebra sencilla) se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde, a esto se le llama hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los cebadores (Rodríguez y Barrera, 2004).

Un aumento de temperatura favorece la especificidad ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con sitios apócrifos del ADN molde.

La ADN polimerasa necesita del grupo OH libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación a partir de donde iniciará la síntesis. Los puentes de hidrógeno estables en las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y comienza a sintetizar el ADN.

Ambas cadenas originales de ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas.

Tabla 2. Reactivos necesarios para llevar a cabo la técnica de PCR

Reactivo	Utilidad
dNTP's (los 4 desoxirribonucleótidos fosfato)	Sustratos para polimerizar nuevo ADN
2 Cebadores o iniciadores (primers) complementarios (Forward y Reverse)	Delimitan la zona de ADN a amplificar
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	Iones divalentes que actúan como cofactores de la polimerasa
Potasio	Iones monovalentes
Solución tampón o amortiguadora	Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la polimerasa
ADN polimerasa (Taq polimerasa)	Corta las cadenas de ADN y ayuda a su elongación
ADN molde	Contiene la región de ADN a amplificar

Extensión o elongación de la cadena.-

La enzima ADN polimerasa actúa tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5'–3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente. Para la Taq polimerasa la temperatura de máxima actividad está en 75-80 °C (72 °C comúnmente usada para evitar alineamientos inespecíficos de los iniciadores). El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. En su temperatura óptima, la ADN polimerasa, polimerizará 1,000 bases en un minuto. (Rodríguez y Barrera 2004).

Elongación final.-

Se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de la PCR, es una etapa única, en ésta, se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado.

Conservación.-

Esta etapa se lleva a cabo a 4-15 °C durante un tiempo definido para conservar la reacción a corto plazo.

4.2 RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Los RFLP's son secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que varían en longitud y que pueden ser separados por electroforesis. Son reconocidas por una enzima endonucleasa de restricción que corta el ADN en un sitio específico de reconocimiento. La enzima reconoce secuencias repetidas de ADN que son naturalmente variables. Para que un RFLP sea considerado un marcador, debe ser polimórfico teniendo más de un alelo.

4.3 SNP's (Single Nucleotide Polymorphism)

Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (por sus siglas en inglés) es una variación en la secuencia de ADN, que afecta únicamente a una sola de las cuatro bases (A, T, C, G) de la secuencia de un genoma. Los SNP's representan el tipo más simple de marcador genético y se refiere a la variación genética con un nivel de probabilidad más bajo: una sola base o solo nucleótido.

Dos tercios de los SNP corresponden a la sustitución de una citosina (C) por una timina (T). Para que esta variación sea considerada SNP, ésta debe darse al menos en un 1% de la población analizada, si no se llega al 1 % no se considera SNP se considera mutación puntual.

4.4 SSR o STR's o Microsatélites (Simple Sequence Repeat o Short Tandem Repeat)

Los Short Tandem Repeats (STR's por sus siglas en inglés) o microsatélites, son secuencias cortas repetitivas de 4-8 pares de bases distribuidos a lo largo de toda el genoma de un microorganismo. La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos. Los microsatélites son neutros, co-dominantes y poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos, a pesar de esto, la variabilidad que presentan es respecto al número de repeticiones, no de la secuencia repetida.

Un microsatélite se encuentra conformado por un motivo repetitivo, en el cual se encuentra contenida la secuencia repetida, y dos regiones flanqueantes, las cuales se encuentran a ambos lados del motivo repetitivo. Para que un microsatélite sea considerado útil como marcador molecular, toda la variación

de la secuencia o polimorfismo debe hallarse dentro del motivo repetitivo y las regiones flanqueantes deben estar altamente conservadas al punto de no presentar ninguna variación de secuencia.

Partiendo de la hipótesis de que en un microsatélite sólo varía el número de repeticiones dentro del motivo repetitivo, los fragmentos que tienen el mismo tamaño tienen la misma secuencia, de manera que todos los fragmentos de un mismo tamaño representarían un alelo. Estos alelos se heredarían de manera co-dominante, es decir, que en cada locus un individuo podría presentar uno o más alelos.

Los bovinos son diploides, poseen dos juegos completos de cromosomas y por lo tanto para un locus microsatélite podemos presentar un alelo (si ambos progenitores transmitieron alelos de la misma secuencia y tamaño) o dos alelos (si cada progenitor le heredó un alelo de diferente tamaño).

Aproximadamente el doble de SNP's son necesarios para garantizar la misma efectividad que los microsatélites para la identificación genética en la raza Angus, aunque que los valores de probabilidad de correspondencia nos indican que los SNP's bialélicos son aparentemente menos afectados por la consanguinidad y la estructura poblacional comparados con los microsatélites (Fernández María *et al.*, 2013).

V. MICROSATÉLITES COMO MARCADORES

El principio básico del rastreo basado en ADN es el que cada animal es genéticamente único y que la propia información del ADN del animal puede ser utilizado para identificar sus productos y subproductos (Yordanov y Angelova, 2006).

En términos simples, el producto es su propia etiqueta y por consecuencia no necesita sistemas externos de etiquetado. Esta forma de identificación tiene sus ventajas particulares, el código es permanente, único por individuo y se mantiene intacto a través de la historia de vida del animal o de los productos.

El ADN colectado en cualquier punto de la cadena de proceso puede ser empatado con la historia del animal, lo que fundamenta las bases para el sistema de trazabilidad. La información generada del ADN rastreado y colectada de la carne, puede ser empatada directamente con la granja de origen minimizando los tiempos y costos de operación de rastreo (Chávez *et al.*, 2004). La Figura 1 y la Tabla 3, muestran la relación del costo – complejidad y las características de muestreo y almacenaje respectivamente, en la implementación del rastreo de la carne usando ADN.

Los sistemas de identificación convencional actualmente implementados en establecimientos TIF, pueden ser complementados, nutridos y reforzados con el sistema molecular propuesto.

La tipificación del ADN es muy precisa y relativamente libre del error humano comparado con los sistemas tradicionales de rastreo. Debido a lo anterior, es posible utilizar el ADN para auditar, evaluar y verificar otros sistemas de rastreo que son vulnerables al error humano.

La implementación del sistema basado en el rastreo de ADN requiere la colección de muestras de ADN (muestra de referencia) directamente de los animales como pelo y sangre y muestras de tejido muscular de la canal. En la práctica, el muestreo resulta sencillo y barato.

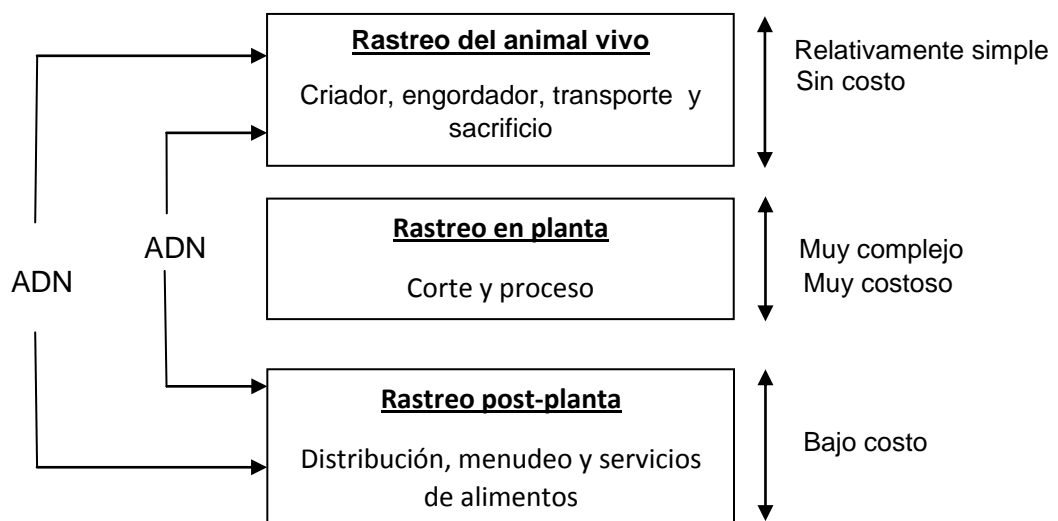
Los microsatélites se han convertido en la herramienta molecular de elección para el análisis genético y el estudio de la identificación animal debido a tres características principales, la primera es que pueden ser segregados de acuerdo a un patrón hereditario, la segunda es que pueden ser encontrados distribuidos a través de todo el genoma y la tercera es que se encuentran compuestos de unidades repetidas conservadas (Felmer *et al.*, 2008).

En los microsatélites, la variabilidad respecto al número de repeticiones consecutivas de las secuencias de ADN, es la que le confiere la propiedad de marcador molecular.

Existen más de 83 microsatélites empleados en estudios poblacionales en bovino, 30 de los cuales son recomendados por la FAO (FAO, 2004) debido a su alta reproducibilidad y polimorfismo. Actualmente el ISAG recomienda el uso de una batería de 10 a 15 microsatélites para estudios de paternidad por presentar un alto contenido de información polimórfica y un alto poder de discriminación combinado (Negrini *et al.*, 2007).

La tasa de mutación de los loci de microsatélites es de 10^2 a 10^6 eventos por locus por generación (Wan, *et al.*, 2004) . Se cree que la tasa será diferente en función del número de nucleótidos en la unidad repetida. (Eckert and Hile, 2009).

Figura 1. Comparación costo - complejidad del rastreo de ADN en los tres pasos más importantes de la cadena de producción de carne



Adaptado de Yordanov y Angelova, 2006

Tabla 3. Características de muestreo y almacenaje de diferentes muestras biológicas

Muestra	Muestreo	Almacenaje	Observaciones
Pelo	-Uso de pinzas planas. -Remoción de pelo del lomo del animal. -Jalar en contra del nacimiento del pelo. Obtención de folículos pilosos visibles.	A 4°C o en cuarto con temperatura controlada.	Usar pelos blancos o negros (evitar pelos rojos o café)
Biopsia	-Remoción con perforadora de la oreja.	A 4°C si se procesa inmediatamente, si no, almacenar a -20°C.	Una perforadora especial es necesaria, tipo Biopsytec.
Sangre	-Usar EDTA como anticoagulante. -Obtención en desangrado. -Agitar la muestra inmediatamente.	De 4° a -20°C.	Evitar hemólisis.
Contra-muestra	-Obtención de canales maduras de cuarto de maduración de algún músculo de fácil acceso. Un sistema de perforación puede ser utilizado para obtener una muestra de tejido.	-20°C.	Los registros de producción son necesarios.

Adaptado de Yordanov y Angelova, 2006

Debido a lo anterior, se puede suponer que los microsatélites como marcadores moleculares, son uno de los mejores sistemas y más confiable para la identificación biométrica de carne de bovino (Filippini *et al.*, 2006).

5.1 Evaluación del Poder de Discriminación de los Microsatélites

Para evaluar el poder de discriminación de los microsatélites como marcadores moleculares, es necesario responder una pregunta básica, si ¿dos de las muestras son del mismo individuo?, o sea genéticamente idénticas o diferentes. La respuesta en el caso de los perfiles de microsatélites de ADN, es cuestión de probabilidad.

Se pretende considerar para un individuo animal, un perfil de repeticiones simples en tándem (STR) consistente de once loci STR. Para una mayor simplicidad, se asume que cada STR tiene cuatro alelos. Para cada STR, el animal posee dos de los cuatro posibles alelos, uno heredado del padre y otro de la madre.

Los dos alelos en conjunto conforman su genotipo, por consiguiente once genotipos representan a los veintidos alelos en los once perfiles de loci STR para este animal (Cunningham y Meghen, 2001). La probabilidad de que otro animal comparta exactamente esta combinación de genotipos es baja. La discriminación efectiva, al punto de identificar un solo animal, depende en reducir esta probabilidad a niveles bajos aceptables.

Es necesario considerar el genotipo para el primer locus STR en el perfil del animal y el genotipo para el mismo locus de una muestra desconocida para la cual se requiere una comparación de identidad genética. Si los dos genotipos son idénticos, la muestra es declarada como idéntica en este locus. Sin embargo existe cierta probabilidad de que el emparejamiento haya sido al azar en lugar de que haya sido por relación genética entre el individuo muestreado y la muestra desconocida.

Para estimar esta probabilidad, se requiere información acerca de la frecuencia del genotipo particular de la población. Para este propósito es necesario el acceso a la información del locus de la población a estudiar. Tal conjunto de datos de la población han sido determinados para la mayoría de las especies animales domésticas y para muchas razas y variedades de estas especies (Kozubzka-Sobocinska *et al.*, 2008).

El contenido de información polimórfica (PIC por sus siglas en inglés) es un parámetro frecuentemente utilizado para medir la capacidad de discriminación de los microsatélites entre diferentes individuos y sus valores pueden variar entre 0 y 1, indicando un alto nivel de polimorfismo o variación cuando el valor es cercano a 1 (Felmer *et al.*, 2008).

Considerando las condiciones del tamaño y tipo de muestreo, se pueden determinar las diferencias en las frecuencias génicas entre las razas, a través de la inferencia estadística de los datos, tomando en cuenta el número y frecuencia de alelos, la heterocigosidad (H), la probabilidad de correspondencia (MP) y como se había mencionado antes, el contenido de información polimórfica (Felmer *et al.*, 2008).

Estos parámetros se considerarán debido a que la capacidad promedio de un sistema de marcadores para excluir y establecer las relación está condicionada por los genotipos de los parientes reportados; por la frecuencia de lindeza de los marcadores alelomorfos en la raza particular y por el número de sistemas de marcadores independientes probados (Riojas-Valdés *et al.*, 2006).

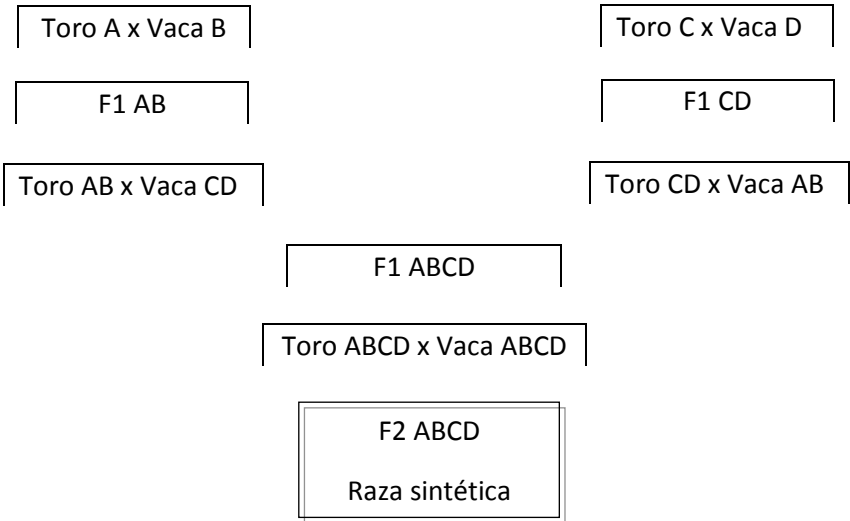
Actualmente para lograr el mejoramiento genético de una población de ganado bovino, se cuenta con tres sistemas: selección, cruzamientos y formación de razas sintéticas de dos o más razas (compuestos).

El beneficio de los cruzamientos y formación de razas sintéticas de dos o más razas (Figura 2), deriva de la combinación favorable de las características de los reproductores cruzantes y del vigor híbrido resultante (cruza). Al ganado

obtenido por cruzamiento de tres, cuatro o más razas, también se le denomina razas sintéticas multirraciales (López, 2000).

Se sabe que la cantidad de marcadores adecuados para obtener una alta eficiencia en la prueba, dependerá de la raza de los animales (animales de raza pura y/o cruza entre diferentes razas también denominadas razas sintéticas - 70 % *Bos taurus*-30 % *Bos indicus*-), además del tamaño de la población (Orrú *et al.*, 2006).

Figura 2. Formación de una raza sintética multirracial derivada de cuatro razas puras



Adaptado de López, 2000.

Mientras que las razas puras necesitan menor cantidad de microsatélites por presentar mayor promedio de similitudes genéticas o menor contenido de variaciones alélicas, las razas sintéticas o entrecruzadas necesitan de una mayor cantidad de marcadores ya que las variaciones alélicas incrementan la distancia genética entre razas (Ciampolini *et al.*, 1995).

5.2 Secuenciación de Fragmentos de ADN por Electroforesis Capilar

El uso de electroforesis capilar para la secuenciación de fragmentos de ADN, involucra la cuantificación del tamaño de los fragmentos de ADN, dicha cuantificación se realiza en relación a estándares internos que se añaden a las muestras a analizar. Actualmente se pueden utilizar de 5-8 marcadores fluorescentes simultáneamente (uno de ellos reservado para el marcador de tamaños moleculares) y combinar diferentes tamaños alélicos en la misma muestra por lo que por cada capilar en una misma electroforesis, se pueden analizar múltiples fragmentos (multicolor) como se muestra en la Figura 3. (Applied Biosystems, 2014).

Durante la electroforesis, un campo eléctrico es aplicado de manera que los fragmentos de ADN cargados negativamente, se mueven hacia el electrodo positivo. La velocidad a la que un fragmento de ADN se mueve a través del medio, es inversamente proporcional a su peso molecular. El proceso puede separar los productos de extensión por tamaño a una relación de una base (Castagnino, 1999).

La electroforesis capilar es un proceso utilizado para separar fragmentos iónicos por sus tamaños. En la instrumentación, una inyección electrocinética se usa para inyectar fragmentos de ADN en solución a cada capilar (Castagnino, 1999).

Durante la electroforesis capilar, los productos de extensión de la reacción de PCR (y de cualquier otra molécula cargada negativamente, tales como la sal, cebadores incorporados y/o nucleótidos) entran al capilar como resultado de la inyección electrocinética. Un alto voltaje de carga aplicado a la

muestra, obliga a los fragmentos cargados negativamente a ingresar a los capilares. Los productos de extensión son separados por tamaño en función de su carga total (Castagnino, 1999).

La movilidad electroforética de la muestra puede verse afectada por las siguientes condiciones:

- El tipo de solución amortiguadora, su concentración y pH.
- La temperatura de procesamiento.
- La cantidad de voltaje aplicado.
- El tipo de polímero utilizado.

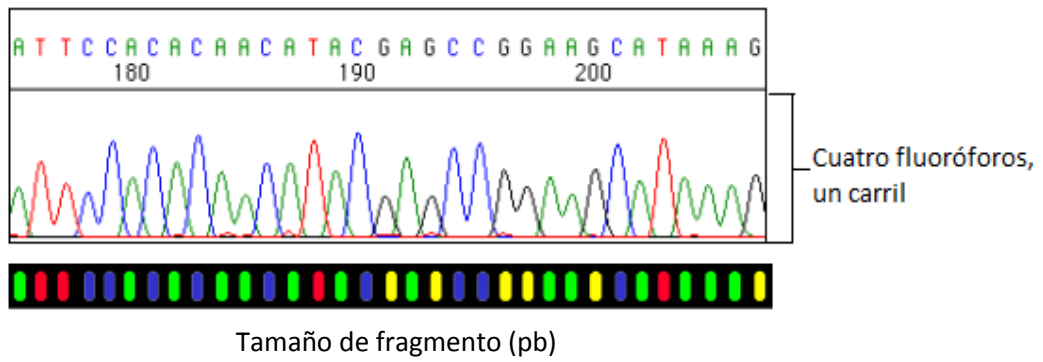
Poco antes de alcanzar el electrodo positivo, los fragmentos de ADN marcados con fluorescencia, separados por tamaño, se mueven a través de la trayectoria de un haz de láser. El haz de láser hace que los fluorocromos adosados a los fragmentos flourezcan. Las señales de los fluorocromos son separados por un sistema de difracción, y una cámara con dispositivo de carga acoplada (o CCD- charge-coupled device por sus siglas en inglés) detecta la fluorescencia (Castagnino, 1999; Applied Biosystems, 2009).

Debido a que cada fluorocromo emite luz a una longitud de onda diferente cuando son excitados por el láser, todos los cuatro fluorocromos, y por lo tanto los loci, pueden ser detectados y distinguidos por una sola inyección capilar (Figura 3).

La señal de fluorescencia es convertida a datos digitales, los mismos son almacenados en un archivo con formato compatible con el software de análisis. Al analizar los fragmentos a través del software del equipo de electroforesis capilar, se determinan:

1.- El tamaño del fragmento: El software utiliza un tamaño estándar en cada muestra para crear una curva estándar para cada muestra, después determina el tamaño relativo del fragmento de la muestra marcada con el colorante y compara el fragmento con la curva estándar para esa muestra en específico.

Figura 3. Secuencia fluorescente por electroforesis capilar



Modificado de Applied Biosystems, 2009.

2.- El Genotipo: Dependiendo del modo de análisis que el usuario elija, el software asigna y determina los alelos y por lo tanto el genotipo.

Uno de los errores más frecuentes se produce al no disminuir la concentración de sal de la muestra debido a que los aniones de sal compiten con el ADN cargado negativamente por entrar al capilar durante la inyección electrocinética. A medida que la concentración de sal incrementa, menos ADN entra al capilar, lo que debilita la señal.

El exceso de sal puede precipitar el ADN en el tubo en presencia de formamida. Es por eso que se debe ser capaz de compensar la intensidad de la señal decreciente, aumentando el tiempo de inyección o el voltaje. Otras formas para desalar la muestra es concentrarla y esto se puede llevar a cabo mediante un microconcentrador o utilizando una membrana de diálisis (Castagnino, 1999; Applied Biosystems, 2009).

VI. HIPÓTESIS

Los parámetros de genética poblacional como la Frecuencia Génica, Contenido de Información Polimórfica (PIC), Heterocigosidad (He) y Probabilidad de Correspondencia (MP) del sistema de trazabilidad molecular propuesto, permiten validar la correcta identificación de los animales en sistemas de trazabilidad convencionales implementados actualmente en tres establecimientos exportadores.

VII. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Implementar un sistema de trazabilidad molecular para carne de exportación, que garantice su identificación durante su proceso de obtención.

7.2 Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones y parámetros para el genotipificado por medio de microsatélites de individuos de dos poblaciones de las razas Charolais y sintéticas en Sonora.
- Confirmar la identidad de la población sujeta al estudio durante la obtención de la carne utilizando parámetros de genética poblacional como la Frecuencia Génica, Contenido de Información Polimórfica (PIC), Heterocigosidad (He) y Probabilidad de Correspondencia (MP).
- Validar el sistema de trazabilidad molecular desarrollado con la información convencional de los sistemas de trazabilidad no biométricos proporcionados.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Selección de los Establecimientos Tipo Inspección Federal (TIF)

Los criterios de selección de los introductores de ganado bovino fueron los siguientes:

- Que el introductor tuviera el ciclo completo de la industrialización de la carne, es decir que contara con acopio y/o cría del ganado, engorda, sacrificio, corte y deshuese y venta directa al público.
- Que el establecimiento TIF de sacrificio contara con autorización para exportar sus productos a Japón y EUA y tuviera un programa de trazabilidad implementado.
- Que los establecimientos de corte y deshuese sean TIF y que estos estuvieran autorizados para exportar sus productos a Japón y EUA y tuvieran un programa de trazabilidad implementado.

En base a lo anterior y a fin de continuar con la cadena productiva de la carne, mantener la certificación TIF de la misma y la elegibilidad para exportar los productos, se seleccionaron dos empresas integradas ubicadas en el municipio de Hermosillo, Sonora. La empresa Rancho El 17, S.A. de C.V., y la empresa Frigorífica Contreras S.A. de C.V. Las cuales fueron denominadas, Empresa A y B, respectivamente.

La planta de sacrificio animal TIF No. 118, denominada “Procesadora y Empacadora Ganadera de Sonora, S.A. de CV.” ubicada en Calle de los Tarahumaras No. 11 Colonia Parque Industrial, Hermosillo, Sonora, México, cuenta con la autorización por parte del SENASICA – SAGARPA para exportar sus productos a Japón, Corea, EUA y Rusia y tiene implementado un programa de trazabilidad como parte del plan HACCP. En éste rastro TIF, las empresas A y B, llevan a cabo el sacrificio humanitario del ganado.

El establecimiento TIF No. 295 “Rancho El 17, S.A. de C.V.” ubicado en Calle Tamaulipas No. 62 esquina Iturbide, Colonia 5 de Mayo, Hermosillo, Sonora, cuenta con la autorización para exportar sus productos a Japón y EUA y tiene implementado un programa de trazabilidad como parte del plan HACCP. En éste establecimiento se lleva a cabo el deshuese de las canales y detallado de los cortes primarios y secundarios de la empresa A.

El establecimiento TIF No. 437 “Frigorífica Contreras, S.A. de C.V.” ubicado en Carretera a Sahuaripa Km. 1 S/N, Colonia Parque Industrial, Hermosillo, Sonora, cuenta con la autorización para exportar sus productos a Japón, Corea y EUA y tiene implementado un programa de trazabilidad como parte del plan HACCP. (www.senasica.gob.mx). Aquí se lleva a cabo el deshuese de las canales y detallado de los cortes primarios y secundarios de la empresa B.

8.2 Obtención de las Muestras

El protocolo de muestreo implementado se presenta en la Figura 4. El muestreo inicial se realizó en el área de desangrado, posterior al noqueo e izado de los animales en el rastro TIF número 118, se muestrearon 15 animales de la raza Charolais para la empresa A y 15 animales de razas sintéticas mexicanas para la empresa B. En el primer muestreo se colectaron de forma directa (corte de la vena Yugular y paquete carotideo) de cada individuo 4 mL

de sangre en tubos Vacutainer® Plus Plastic K2 con 75 mm de aditivo EDTA como anticoagulante seco micronizado. Las muestras fueron resguardadas a temperatura de refrigeración ≤ 4 °C.

Una vez que el proceso de faenado concluyó, y 48 hr después del mismo, las canales de cada introductor fueron enviadas a cada una de las salas de corte y deshuese de cada uno de los introductores. El segundo muestreo se realizó en el área de proceso previo al empaque del TIF No. 295 para la empresa A y del TIF No. 437 para la empresa B. Los 50 g de muestra de cada canal, fueron colectadas de manera directa del músculo *Longissimus dorsi* (entre la doceava y treceava costilla –ojo de la chuleta-) con ayuda de hojas de bisturí estériles, fueron depositadas en bolsas estériles Whirlpack y guardadas en refrigeración ≤ 4 °C.

El tercer y último muestreo de músculo (50 g de cada individuo), se realizó de 24 a 72 hr después de su corte y deshuese, la toma de las mismas se llevó a cabo de forma directa de los cortes del ojo de la chuleta en los puntos de venta al público de cada introductor, Tienda TASTE® para la empresa A y Tienda FRICONSA® para la empresa B, utilizando hojas de bisturí estériles, fueron depositadas en bolsas estériles Whirlpack y guardadas en refrigeración ≤ 4 °C.

8.3 Extracción, Purificación y Análisis del ADN

8.3.1 Protocolo de Extracción y Purificación del ADN de Sangre

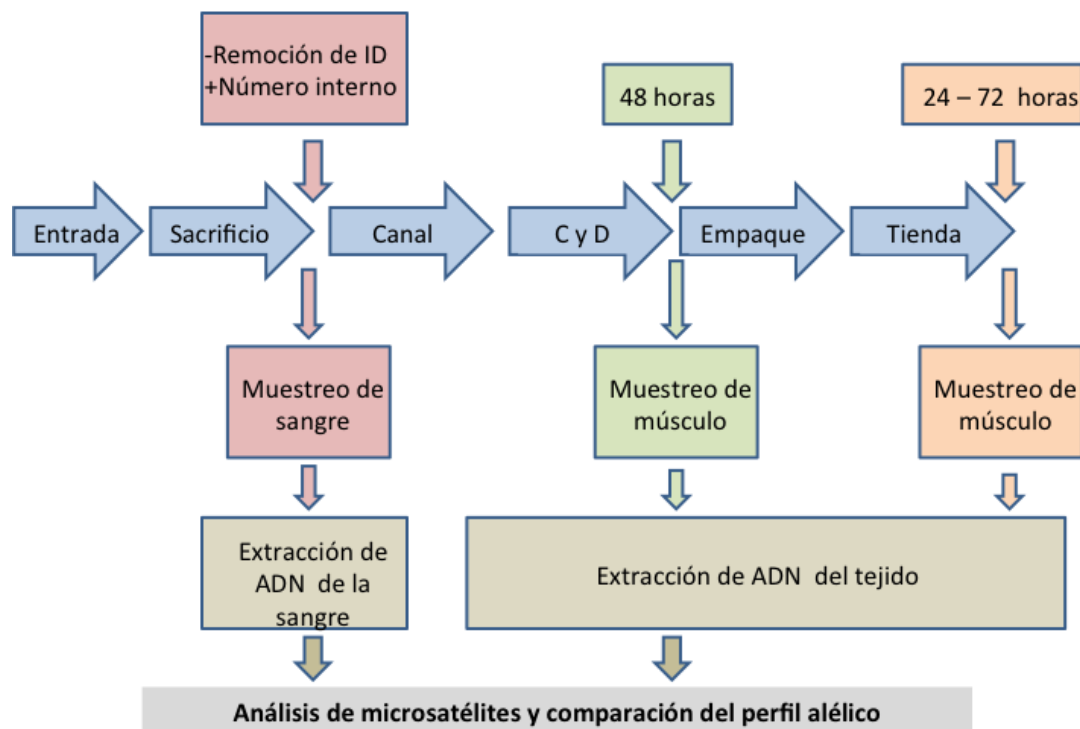
El ADN de las muestras de sangre se extrajo usando el kit comercial de Wizard Genomics, Promega, Wisconsin, USA.

Se transfirieron 300 μ L de sangre de los tubos Vacutainer a un tubo estéril de micro centrífuga de 1.5mL con 900 μ L de solución amortiguadora de lisis celular (Tris-Hcl 0.5 mM, NaCl 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%) invirtiendo el tubo de 5 a 6 veces para mezclar. Se incubó la mezcla por 10 min a temperatura

ambiente invirtiendo de 2 a 3 veces durante la incubación para lisar los eritrocitos. Se descartó el sobrenadante y se agitó vigorosamente de 10 a 15 segundos hasta que los leucocitos fueron re suspendidos. Se añadieron 15 μ L de solución RNAsa y se mezcló invirtiendo de 2 a 5 veces. La mezcla se incubó a 37 °C por 15 min y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μ L de solución de precipitación proteica y se agitó vigorosamente por 20 segundos. Se centrifugó a 16,000 x g por 3 minutos a temperatura ambiente.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo de micro centrífuga nuevo de 1.5 mL previamente cargado con 300 μ L de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló la solución gentilmente por inversión. La mezcla se centrifugó a 16,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente en esta fase fue posible observar un pequeño pellet blanco de ADN. Una vez decantado el sobrenadante se añadieron 300 μ L de etanol al 70% a temperatura ambiente y se invirtió gentilmente para lavar el pellet de ADN y el tubo que lo contiene. Se aspiró con una micropipeta el etanol y se dejó secar el tubo abierto invertido en papel secante por 15 minutos. Se añadieron 100 μ L de solución rehidratante de ADN y se incubó a 65 °C por 1 hr para posteriormente incubarla en temperatura de refrigeración 4 °C durante toda la noche, el ADN se guardó a esta misma temperatura. (Wizard Genomics DNA Purification Kit, 2014).

Figura 4. Implementación del muestreo para la trazabilidad molecular en la cadena productiva



8.3.2 Protocolo de Extracción y Purificación del ADN de Músculo

El ADN de las muestras de músculo se extrajo usando el kit comercial Wizard Genomics, Promega DNA , Wisconsin, USA.

Se homogenizaron 50 g de músculo en 500 μ L de solución amortiguadora de lisis nucleica (Tris-Hcl 0.5 mM, NaCl 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%) y 120 μ L de EDTA pH 8 en un tubo estéril de micro centrífuga de 2 mL. Se añadieron 20 μ L de proteinasa K (Invitrogen, EUA, Madison) y el homogenizado se incubó a 65 °C y 600 rpm de 18 - 21 horas. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 min. En la purificación del ADN se agregaron 200 μ L de solución de precipitación proteica WIZARD™ y se agitó vigorosamente en un termomixer (Thermo-Scientific, Alemania, Hilden) a 2000 x g por 20 segundos, posteriormente se enfrió en hielo por 5 minutos y se centrifugó por 4 min a 16,200 x g. El sobrenadante fue removido cuidadosamente con una micropipeta y transferido a un tubo nuevo previamente cargado con 600 μ L de isopropanol, la mezcla fue invertida gentilmente varias veces. Se centrifugó en una centrífuga 2900 H (Eppendorf Alemania Hilden) por 1 min a 16,200 x g y se aspiró con una micropipeta el sobrenadante, en este punto es visible un pequeño pellet blanco de ADN, se le añadieron 600 μ L de etanol al 70% temperatura ambiente y se invirtió gentilmente de 3 a 5 veces para lavar el pellet blanco y el tubo que lo contiene. Se centrifugó a 16,200 x g por 1 min, se aspiró el etanol con una micropipeta y se dejó secar el tubo abierto invirtiéndolo en papel secante por 15 minutos. Al pellet seco se le añadieron 100 μ L de solución rehidratante de ADN, se incubó 1 hr a 65 °C, se enfrió a temperatura ambiente por 5 minutos y se dejó incubar toda la noche a 4 °C en refrigeración, el ADN se guardó a esta misma temperatura (Wizard Genomics DNA Purification Kit, 2014).

8.4 Concentración y Pureza del ADN Extraído

La cuantificación de nuestro ADN molde es un punto crucial y crítico para el éxito de las reacciones de secuenciación. La forma más común de determinar la cantidad de ADN, es medir la absorbancia (densidad óptica o D.O.) de una muestra a 260 nm en un espectrofotómetro.

Una unidad de densidad óptica es la cantidad de una sustancia, disuelta en 1.0 mL, que da una lectura de absorbancia de 1.00 en un espectrofotómetro con una longitud de trayectoria de 1cm. Para la cuantificación de ADN, se asume que la longitud de onda es de 260 nm, a menos que se indique lo contrario.

Los valores de A_{260} pueden ser convertidos a ng/ μ L usando la Ley de Beer's:

Absorbancia (260 nm)= \sum contribuciones de coeficiente de extinción X abertura de la cubeta X concentración

La siguiente fórmula es derivada de la Ley de Beer's (Ausubel *et al.*, 1998):

Concentración de doble hebra de ADN= $A_{260} \times 50$ ng/ μ L.

En el presente estudio se verificó la calidad de las extracciones de ADN, las muestras se analizaron en un espectrofotómetro NanoDrop™ The Thermo Scientific, a fin de establecer la concentración de ADN presente a partir de una densidad óptica de lectura de 260 nm y se evaluó la relación 260/280 para verificar la pureza y exceso de proteínas.

8.5 Verificación de la Integridad de ADN por Gel de Electroforesis

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X (Tris 0.4 mM, ácido acético 0.2 mM, EDTA 0.01 mM pH 8.3) y 2 mg de SybrSafe, durante

30 min, a 80 Voltios. El gel se visualizó con ayuda de un fotodocumentador UV donde se juzgó la calidad, al determinar si no hay fragmentación o un barrido del ADN.

8.6 Amplificación de Gen Constitutivo Correspondiente a *Bos taurus* por PCR Punto Final

Para confirmar la presencia de la especie bovino (*Bos taurus*), se amplificó la secuencia de oligonucleótidos reportados por (Horsburgh *et al.*, 2013). En la Tabla 4, se muestran las condiciones del PCR punto final para llevar a cabo la amplificación del gen constitutivo, así como la secuencia de los cebadores específicos del mismo.

Se identificó el gen del ADN mitocondrial (ADNm) con amplicones de 271 pb recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal y el GenBank J01394, realizando electroforesis en gel de agarosa al 1 % en solución amortiguadora TAE 1X (Tris 0.4 mM, ácido acético 0.2 mM, EDTA 0.01 mM pH 8.3) y 2 mg de SybrSafe™, durante 30 min., a 80 Voltios. El gel se visualizó con ayuda de un foto-documentador UV donde se compararon las bandas de las muestras de sangre y músculo con un marcador molecular de 100 – 3000 pb. (Arana *et al.*, 2002; Ilkah *et al.*, 2006; (www.isag.org.uk/journal/comparisonguide)).

Tabla 4. Secuencias de cebadores y condiciones de PCR punto final para la amplificación del gen constitutivo correspondiente a *Bos taurus*

Parámetros	Condiciones
Desnaturalización	95 °C por 45 seg
Alineación	58 °C por 45 seg
Extensión	72 °C por 60 seg
No. de ciclos	30

Bovino F (forward) 5' – GCCATATACTCTCCTTGGTGACA -3'

Bovino R (reverse) 5' – GTAGGCTTGGGAATAGTACGA -3'

Adaptado de Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2010

8.7 Amplificación de 11 Microsatélites por PCR Punto Final

El ADN de cada individuo se tipificó independientemente para cada uno de los 11 microsatélites recomendados (Tabla 5) por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG por sus siglas en inglés) (Negrini *et al.*, 2007) cuyo kit comercial contiene los siguientes componentes:

- Mezcla de cebadores de amplificación que contiene una cantidad equilibrada de cada uno de los cebadores de avance (forward) marcado con colorante y su correspondiente inverso de retroceso (reverse).
- Solución amortiguadora para PCR StockMarks®
- Mezcla de dNTP's.
- ADN control (20 ng/μL).
- AmpliTaq Gold ADN polimerasa (5 U/μL).

La mezcla de reacción múltiple para 11 microsatélites (11-plex-PCR) se preparó con las siguientes características:

En un tubo de 0.5 mL se añadieron 3.0 μL de solución amortiguadora para PCR, 4.0 μL de la Mezcla de dNTP's, 0.5 μL de AmpliTaq Gold ADN polimerasa, 5.5 μL de mezcla de cebadores de amplificación, 1.0 μL de agua desionizada para un volumen total de 14 μL por tubo de reacción. Se diluyó el ADN control y el ADN muestra en agua libre de nucleasas, 1:8 y 1-10 ng/μL respectivamente. La mezcla se agitó vigorosamente y se transfirió a un tubo de PCR conteniendo 1.0 μL de ADN (de 41 ng/μL a 2,314 ng/μL) por tubo. Se agitó vigorosamente por un corto tiempo y se centrifugó a 6,000 x g por 15 segundos.

Las PCR's se llevaron a cabo usando un kit comercial de cebadores fluorescentes siguiendo las instrucciones del fabricante (Negrini R *et al.*, 2007; Applied Biosystems, 2014), usando un termociclador para la amplificación de ADN (Eppendorf Mastercycler® Gradient 5331, Hamburgo, Alemania) con las condiciones que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 5. Microsatélites de bovino seleccionados para el estudio de las razas sintéticas mexicanas*

Nombre	Secuencia del cebador (5'3')	Cromosoma	Amplicón (pb)**	Tm
Bovino	F: GCCATATACTCTCCTTGGTGACA R: GTAGGCTTGGGAATAGTACGA	ADNm	271	61
BM1824	F: GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC R: CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	1	179 - 189	58
BM 2113	F: GCTGCCTTCTACCAAATACCC R: CTTCTGAGAGAAGCAACACC	2	122 - 142	58
ETH3	F: GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG R: ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	19	117 - 129	55-56
ETH10	F: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA R: CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	4	207 - 225	67
ETH225	F: GATCACCTTGCCACTATTTCTC R: ACATGACAGCCAGCTGCTACT	9	133 - 157	67
INRA23	F: GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC R: TAACTACAGGGTGTAGATGAACTC	3	197 - 221	55
SPS115	F: AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG R: AACGAGTGCCTAGTTTGGCTGTG	15	242 - 258	58
TGLA53	F: GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA R: ATCTTACATGATATTACAGCAGA	16	144 - 190	55
TGLA122	F: CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC R: AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	21	136 - 180	60
TGLA126	F: CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT R: TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	9	115 - 131	60
TGLA227	F: CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT R: ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	18	79 - 99	60

*Adaptado de Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2010. **El rango de tamaños esperados puede variar de 1-6bp. (Applied Biosystems, 2014)

Tabla 6.- Tiempos y temperaturas de amplificación de microsatélites por PCR punto final

Microsatélite	Paso Inicial	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión Final	Paso Final	Mantenimiento
Mezcla de 11 microsatélites BM1824, BM 2113, ETH3, ETH10, ETH225, INRA23, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126 y TGLA227.	1 Ciclo	Cada uno de 31 ciclos			1 Ciclo	1 Ciclo	
	95 °C/15 min	94 °C/45 s	45 °C/6 s	72°C/60 s	72 °C/60 s	25 °C/120 s	4 °C

Una vez amplificados los productos de la PCR, se almacenaron en refrigeración (2-4 °C) hasta su posterior análisis por electroforesis capilar para determinar el tamaño de los productos de PCR coloreados.












8.8 Uso de Fluorocromos para el Análisis de Fragmentos de ADN por Electroforesis Capilar

Un fluorocromo es un grupo funcional de una molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir en otra determinada de mayor longitud de onda, o sea, es capaz de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda diferente, es decir fluoresce. La Tabla 7 y la Figura 5 muestran y ejemplifican el espectro de emisión, la intensidad relativa, la coloración y el microsatélite al que corresponden los fluoróforos utilizados en el presente estudio. (Life Technologies Corporation, 2012 y 2014).

8.9 Secuenciación de Productos de PCR por Electroforesis Capilar

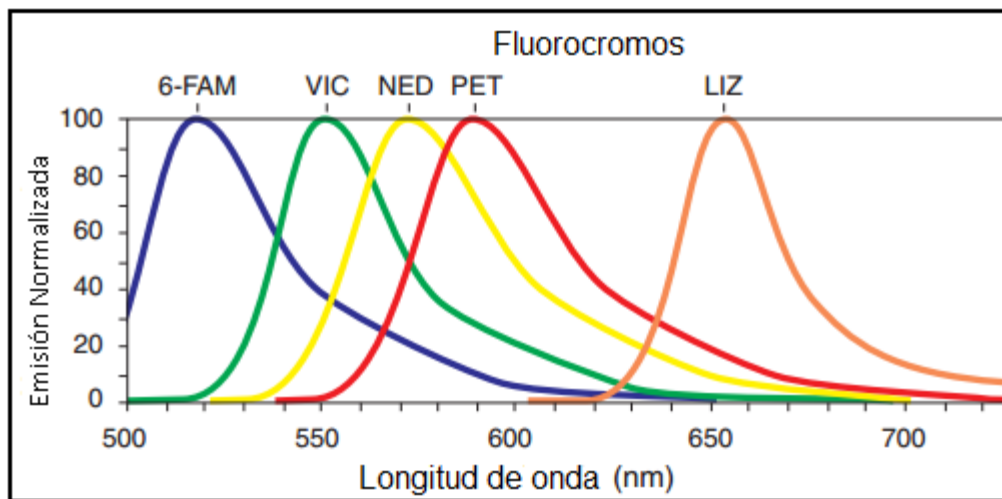
Los productos de la PCR se analizaron a través de electroforesis capilar para la separación y detección de los microsatélites usando un secuenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, San Diego, CA, EUA) que cuenta con un arreglo de 48 capilares y una columna de 50 cm, así como una capacidad de 96 a 384 muestras en el mismo plato para la secuenciación de fragmentos de ADN. En la preparación de los productos de PCR se utilizó un set de filtros F con una matriz DS-32 Dye Primer Matrix Standard. Para cada muestra analizada, se diluyó cada reacción de amplificación de PCR con 150 µL de agua desionizada ajustando la misma y la cantidad de productos de PCR dependiendo de la concentración inicial de ADN.

Tabla 7. Espectro de emisión, intensidad relativa, coloración y STR al que corresponden los fluoróforos utilizados en este estudio.

Fluoróforo	STR	Max A (nm)	Max E (nm)	Intensidad relativa RFU		Coloración
5-FAM™	BM2113,ETH10,	494	530	100	+ ↓ -	
6-FAM™	SPS115,TGLA53, TGLA227	494	522	100		
VIC®	INRA23,	538	554	100		
JOE™	TGLA122,	528	554	100		
HEX™	TGLA126	535	553	50		
NED™	BM1824, ETH3, ETH225	546	575	40		
TAMRA / TAMRA™	-	560	582	25		 
PET®	-	558	595	25		
ROX™	-	587	607	12		
LIZ®	-	638	655	50		

Adaptado de Life Technologies Co., 2012 y 2014.

Figura 5. Espectro de emisión de los fluorocromos utilizados en el estudio



Adaptado de Life Technologies Co., 2012

En un tubo de 0.5 mL se mezclaron 1.0 μ L de los productos de la reacción de la mezcla de 11 microsatélites, 11.5 μ L de Hi-Di Formamide y 0.5 μ L del colorante GeneScan-350 ROX tamaño estándar. Se centrifugaron por 15 seg en un aparato de micro centrífuga, se calentaron a 95 °C por 2 minutos e inmediatamente se enfriaron en hielo por 3 min. (Applied Biosystems Co, 2014).

Los perfiles de secuencia se analizaron usando un Genescan and Genotyper Software (Applied Biosystems), utilizando de 1 a 6 μ L de reacción.

Ocasionalmente se observan alelos que caen fuera de los rangos de tamaño esperados para el mismo y que se superponen con el rango de tamaño esperado de otro locus es un comportamiento que se ha observado. Estos alelos se pueden presentar en una frecuencia extremadamente baja en una población. Éstos pueden ser observados según incrementa el número de animales individuales genotipados en la población y/o cuando diferentes razas son incluidas en la misma población de estudio.

8.10 Análisis Estadístico

Para poder abordar el análisis probabilístico del presente estudio, fue necesario referirnos primeramente al Principio de Hardy – Weinberg ya que éste establece que los alelos y frecuencias alélicas o frecuencias génicas, permanecen en una población de manera constante de generación en generación en ausencia de influencias evolutivas en una condición ideal (llámese mutación, selección de pareja, flujo genético o migración, entre otros).

Esto quiere decir que la frecuencia alélica nos indica la proporción que se observa de un alelo específico respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en la población. Si las frecuencias permanecen constantes de una generación a la siguiente, la población no está experimentando cambio evolutivo, y se dice que está en equilibrio génico.

La pérdida de alelos (allele dropout) ocurre cuando en una muestra analizada, uno o más alelos no están presentes y esto se puede deber a varios factores como lo son:

-Que la cantidad inicial de ADN analizada sea muy baja, resultando en la falla al amplificar uno o más alelos de la muestra.

-Una mutación en el sitio de unión de algún cebador que cause falla en la amplificación de alelos.

-Que un alelo exceda los rangos normales de tamaño en un locus particular de manera que sea indetectado.

Por último, se denomina deriva genética al efecto de muestreo en una población de poco tamaño y que causa un cambio aleatorio en las frecuencias génicas.

En este caso la población de estudio son los bovinos y las subpoblaciones contrastadas son las razas Charolais (Empresa A del Introdutor No. 1) y razas sintéticas mexicanas (Empresa B del Introdutor No. 2).

En el presente estudio se tomaron en cuenta los parámetros derivados de los datos de genotipos como son los cálculos de número y frecuencias alélicas, heterocigosidad (H) –heterocigosidad esperada (H_e) vs heterocigosidad observada (H_o), contenido de información polimórfica (PIC) y probabilidad de correspondencia (MP).

Para procesar los datos en los modelos estadísticos previamente descritos, se eliminaron los valores extremos ajustándolos a cifras significativas (dígitos de un numero que consideramos no nulos).

8.10.1 Determinación de Número y Frecuencias Alélicas

Las frecuencias alélicas se definen como el cociente resultante de dividir el número de alelos iguales en una población entre el número total de alelos. El cálculo de las frecuencias se hace por recuento directo de los alelos frecuentes, asumiendo que la observación de un solo alelo se corresponde con la condición de homocigosis (Estévez, 2009). El conteo es directo y se contrasta mediante la ecuación reportada por (Riojas-Valdés *et al.*, 2006).

$$P_{ki} = F_i/n$$

Donde P_{ki} es la frecuencia del alelo i , F_i es el número de observaciones de cada alelo entre el número total (n) de observaciones de todos los alelos.

8.10.2 Polimorfismo

El polimorfismo no indica qué tanta variación tiene un gen de estudio (loci, locus). Un gen se define como polimórfico si la frecuencia de uno de sus alelos es menor o igual a 0.95 o 0.99.

$$P_j = q \leq 0.95$$

$$P_j = q \leq 0.99$$

Donde P_j es la tasa de polimorfismo y q la frecuencia alélica.

El cálculo se hace por observación directa, viendo si se cumple o no la definición.

8.10.3 El Contenido de Información Polimórfica

El contenido de información polimórfica (o PIC por sus siglas en inglés) (Botstein *et al.*, 1980), es un indicador de calidad de un marcador en estudios

de cartografía genética. Es muy usado en la actualidad para reflejar el polimorfismo detectado y nos indicará el grado de variabilidad existente en cada uno de los marcadores genéticos analizados en las razas de bovino utilizando la ecuación propuesta por Weiss, (1996).

$$PIC = \sum_{k=1}^m \left(1 - \sum_{i=1}^n P^2 K_i - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P^2 K_i - P^2 K_j \right)$$

Donde m = al número de loci (marcadores empleados); n = al número de alelos del locus k ; y $P_{K_{j(i)}}$ es la frecuencia alélica estimada del alelo $j(i)$ del locus k .

8.10.4 Determinación de la Heterocigosidad

La Heterocigosidad nos indica el grado de polimorfismo existente en cada par alélico, dado que cada uno proviene de un precursor. La mejor valoración de la variación genética es la heterocigosidad de la población media como la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus (Lacadena, 1981). Se acepta generalmente que un locus es polimórfico cuando el alelo más común tiene una frecuencia inferior a 0.95. Una medida de la variación genética es la proporción de loci polimórficos o simplemente polimorfismo en una población.

La heterocigosidad se considera como la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus.

8.10.5 Heterocigosidad Observada

La heterocigosidad observada, es la proporción de individuos heterocigotos observados en una muestra de la población, si se calcula a partir de los genotipos encontrados en la población para todos los *loci* se denomina heterocigosidad media observada. La heterocigosidad de una población se mide primeramente determinando la proporción de genes que son heterocigóticos para un gen en particular.

La heterocigosidad observada se calcula con la fórmula propuesta por Nei, (1973).

$$H = 1 - \sum Pki^2$$

Donde Pki es la frecuencia del alelo i .

Esta H_e si hacemos su promedio para todos los loci, se obtiene una medida de la variable genética de una población. Su valor varía entre 0 y 1 y se maximiza cuando varios alelos poseen frecuencias similares.

8.10.6 Determinación de la Probabilidad de Correspondencia (MP)

La MP, indica la probabilidad que dos animales muestren el mismo perfil alélico o huella génica por casualidad y se calcula siguiendo el modelo propuesto por Weir, (1996).

$$MP = \pi \left(\sum_{k=1}^m \sum_{i=1}^n (P^2 Ki)^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n (2P^2 Ki - P^2 Kj)^2 \right)$$

Donde m = al número de locis (marcadores empleados), n = al número de alelos del locus k ; $PK_{i(j)}$ es la frecuencia alélica estimada del alelo $i(j)$ del locus k .

Los valores de frecuencias alélicas, PIC y heterocigosidad se determinaron utilizando el software Molkin V3.0 el cual es un programa computacional para el análisis genético de poblaciones que utiliza información molecular de coascendencia (Gutiérrez *et al.*, 2005).

IX. IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA DE TRAZABILIDAD MOLECULAR EN DOS ESTABLECIMIENTOS TIF DE CORTE Y DESHUESE Y UNO DE SACRIFICIO

Una vez seleccionados los introductores y los establecimientos TIF que conforman la cadena productiva integrada de la carne (engorda, sacrificio, corte y deshuese y venta directa al público), se verificó el sistema de trazabilidad convencional implementado en el establecimiento de sacrificio realizando un ejercicio de trazabilidad y recuperación de producto tomando en cuenta toda la información generada antes, durante y después de los proceso propio de faenado, esto abarca desde la recepción de los animales en el establecimiento de sacrificio, el envío de las canales a las salas de corte y deshuese, el envío de piezas primarias y secundarias a puntos de venta desde el establecimiento de corte y deshuese y por último la ubicación de la mercancía en los puntos de venta.

Al verificar el sistema de trazabilidad convencional implementado en la planta de sacrificio, se determinaron los puntos críticos o de mayor riesgo donde las canales son susceptibles de perder o quedar desprovistas de identificación individual, lo cual pudiese representar un punto de riesgo de adulteración de la información del proceso.

Se tomaron como guías del sistema de trazabilidad molecular, los sistemas individuales que cada uno de los introductores tienen implementados en sus establecimientos de corte y deshuese, así como el implementado en la planta de sacrificio y puntos de venta.

Es necesario recalcar la importancia de los sitios de muestreo a implementar en el sistema de trazabilidad, ya que el éxito del mismo dependerá de la capacidad del sistema de identificar a los animales aún cuando se encuentren desprovistos de identificación convencional, de igual manera y es imprescindible poner énfasis en las buenas prácticas de toma, manejo, etiquetado y envío de las muestras colectadas.

A continuación se enlistan algunas recomendaciones para la toma de muestras en los establecimientos de sacrificio (área de desangrado), corte y deshuese (área de empaque) y puntos de venta:

- Ubicar cómo y dónde se encuentran identificados los animales y/o piezas primarias o secundarias para localizar su identificación individual.
- Ubicar desde el inicio de las operaciones cuántos operarios se encuentran laborando en el área (observar el ritmo y manera de trabajar de cada uno de ellos para adaptarse al ritmo de la línea y evitar posibles accidentes).
- Comprobar que los esterilizadores se encuentren por lo menos a 83 °C (es necesario esterilizar los utensilios de colecta entre muestra y muestra para evitar contaminación cruzada).
- Ubicar la mejor posición para situar el material de trabajo, fijarlo firmemente y ordenarlo según actividades.
- Determinar la mejor área para depositar los desechos que se generan durante el muestreo (guantes, bolsas, tubos inservibles, entre otros).
- Mantener comunicación constante y activa con los operarios.

Se comparó el perfil genético de los fragmentos específicos del panel de 11 microsatélites de cada uno de los animales contrastando los resultados de los tres puntos de muestreo (planta de sacrificio, planta de corte y deshuese y punto de venta) de cada empresa.

X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Extracción y Purificación de ADN

A fin de obtener la mayor concentración y la más alta pureza de las muestras de ADN a través del (Wizard Genomics DNA Purification Kit, 2014), se probó el protocolo a diferentes tiempos de incubación con solución de lisis nucleica y proteinasa K. En la Figura 6, se observa que el incremento de la duración del tiempo de incubación de la muestra, está directamente relacionado con el incremento en la concentración de ADN obtenido por lo que se decidió estandarizar la incubación a 18 h.

10.2 Integridad de ADN por Gel de Electroforesis

La calidad del ADN evaluada desde la perspectiva de contaminación de proteína (260/280 nm) se situó entre 1.64 y 2.19 para la empresa A y entre 1.62 y 1.92 para la empresa B. La contaminación por ARN y carbohidratos (260/230 nm) resultó entre 1.65 y 2.1 y entre 1.67 y 2.17 respectivamente. Estos valores obtenidos indicaron que el ADN era apto para su amplificación mediante PCR. La concentración del ADN extraído para cada uno de los introductores se encontró en un rango de 41.2 a 2,314 ng/ μ L y entre 43.2 y 2,691.6 ng/ μ L respectivamente, como se muestra en las tablas 8 y 9. La integridad de este ADN, determinada mediante su separación por electroforesis en gel de agarosa,

fue confirmada mediante la obtención de bandas definidas mostradas en la Figura 7.

Figura 6. Variación de la concentración de ADN a diferentes tiempos de incubación en solución de lisis nucleica y proteinasa K.

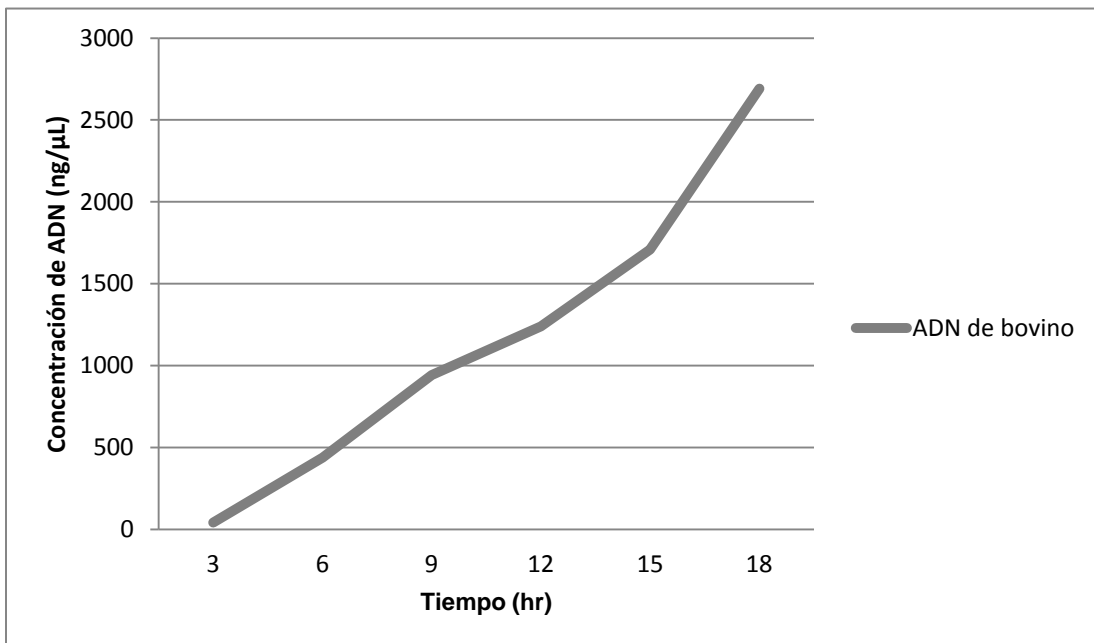
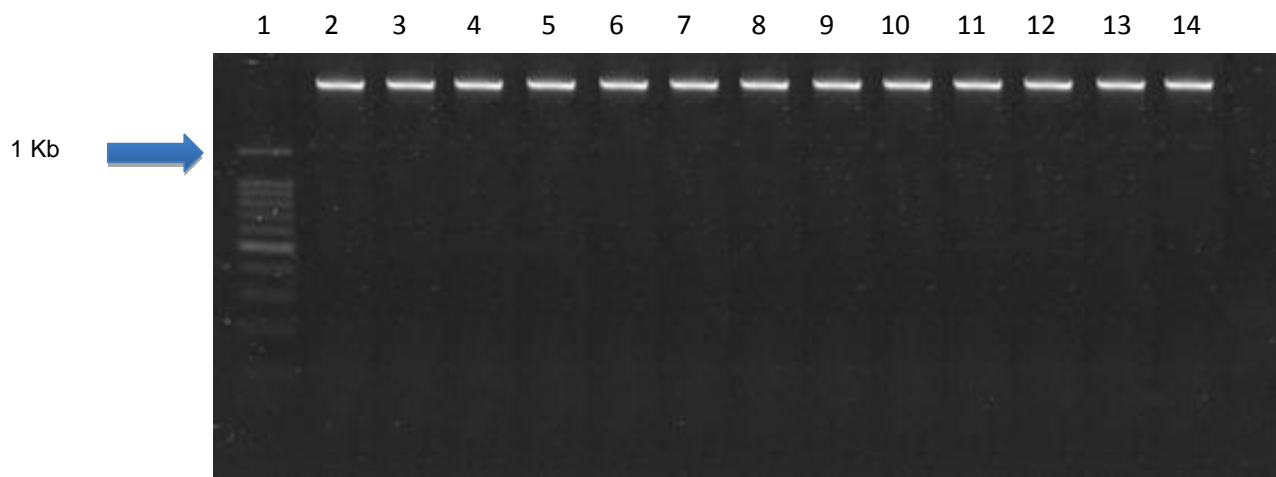


Figura 7. Confirmación de la integridad de ADN analizado por gel de electroforesis.



Perfil electroforético de ADN extraído bajo estudio. Gel de agarosa al 1%. Carriles 1: Marcador molecular 1Kb. Empresa A: 2: 7-R17-SR-1; 3: 20-R17-SR-2; 4:15-R17-P1-2; 5: 24-R17-P1R-2; 6: 01-R17-P2R-2; 7: 13-R17-P2-1. Empresa B: 8: 119-C-S-2; 9: 121-C-S-1; 10: 112-C-P1R-1; 11: 105-C-P1R-1; 12: 105-C-P2-1; 13: 106-C-P2R-2; 14: 107-C-P2-1.

Tabla 8. Rango de concentraciones y valores de pureza de ADN para las muestras colectadas de la Empresas A

Muestra	Concentración ng/ μ L	Pureza 260/280	Pureza 260/280 (valor teórico)
Sangre	339.8 - 1709.5	1.73 – 2.19	
Músculo 1	131.5 - 2314	1.62 – 1.9	1.80 - 2.0
Músculo 2	41.2 - 755.9	1.64 –1.89	

Tabla 9. Rango de concentraciones y valores de pureza de ADN para las muestras colectadas de la Empresa B

Muestra	Concentración ng/μL (rango)	Pureza 260/280 (rango)	Pureza 260/280 (valor teórico)
Sangre	191.8 – 2691.6	1.69 – 1.92	
Músculo 1	43.2 – 699.3	1.62 – 1.8	1.80 - 2.0
Músculo 2	228 – 807.4	1.64 – 1.85	

10.3 Amplificación de un Gen Constitutivo Correspondiente a *Bos taurus* por PCR Punto Final

Previo a la amplificación del panel de 11 microsatélites se confirmó la presencia de la especie bovino al amplificar la secuencia de oligonucleótidos (forward y reverse) del gen del ADN mitocondrial como testigo. El gel coloreado se visualizó con ayuda de un foto-documentador UV Molecular Imager® Gel Doc™ XR System de Bio-Rad donde se compararon las bandas de las muestras de sangre, músculo y muestra blanco con un marcador molecular de 100–3000 pb obteniendo amplicones de 271 pb correspondientes al gen constitutivo para *Bos taurus* como se muestra en la Figura 8. (www.isag.org.uk/journal/comparisonguide; Ilkah, *et al.* 2006; Arana, *et al.*, 2002).

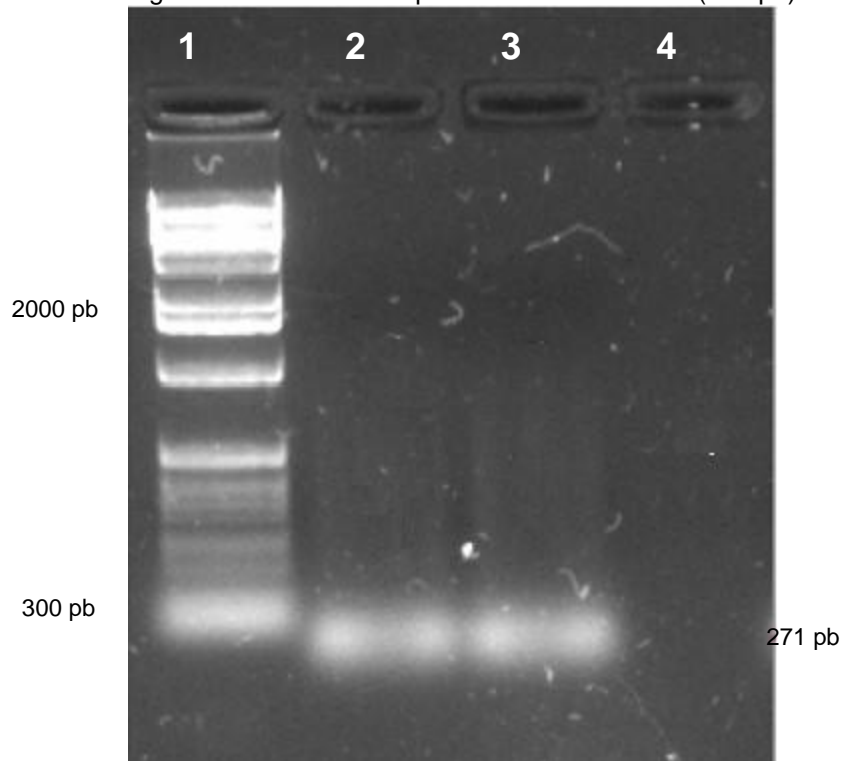
10.4 Purificación de muestras por ensayo PicoGreen™

Al evaluar la absorbancia del ADN a una longitud de onda de A_{260} , se obtuvo el valor de la concentración de cada ADN como referencia para el ajuste de la concentración de todas las soluciones de ADN en una proporción de 0.1 y 1 ng/ μ L para ser cuantificadas por el ensayo PicoGreen™. Los valores de concentración para la Empresa A se situaron entre 38.15 y 167.20 ng/ μ L y para la Empresa B entre 18.49 y 162.21 ng/ μ L, las mismas se consideran concentraciones óptimas de ADN para llevar a cabo el análisis de fragmentos por electroforesis capilar.

10.5 Amplificación de 11 Microsatélites por PCR Punto Final

Una vez cuantificado el ADN de cada una de las muestras, se amplificaron los microsatélites a través de PCR siguiendo las recomendaciones de Applied Biosystems® para su Kit comercial StockMarks®.

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación de gen constitutivo correspondiente a *Bos taurus* (271 pb)



Carril 1, marcador molecular 3 Kb Extension Ladder; carril 2, muestra de sangre; carril 3, muestra de músculo; carril 4, muestra blanco.

Los kits de genotipificación para bovino de la marca comercial StockMarks®, emplean un proceso de PCR para la amplificación de los microsatélites utilizando cebadores marcados con fluorescencia. Los mismos se encuentran recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG).

10.6 Secuenciación de Productos de PCR por Electroforesis Capilar

Una vez obtenidos los amplicones resultantes de la amplificación por PCR de cada una de las muestras, con sus respectivas repeticiones de diferentes etapas de la cadena productiva de la carne, los mismos se sometieron al análisis de fragmentos por electroforesis capilar para corroborar la identidad única de cada individuo.

Al obtener los picos de detección de los cebadores marcados con fluorocromos específicos arrojados por los electroferogramas, se establecieron los valores (peso pb) y la distinción entre homocigosis (alelos iguales) y heterocigosis (alelos diferentes) de cada uno de los alelos de los microsatélites de la Empresa A y de la Empresa B como se muestra en las Figuras 9 y 10, respectivamente.

La igualdad de los valores de detección de fluorescencia de cada microsatélite, determinados en los electroferogramas (peso pb) para una misma muestra en sus tres repeticiones de la cadena de proceso de la carne, nos crea una huella genética que nos indica si es el mismo animal o no.

En este caso para la Empresa A, únicamente 4 muestras, o sea el 8.88% no correspondieron con sus dos repeticiones homólogas. Las huellas génicas de las muestras 3RS, 5RS, 10RS y 15RS no coincidieron con sus pares muestreados en el establecimiento de corte y deshuese ni con sus pares muestreados en los puntos de venta.

Para la Empresa B, el 13.33 % de las muestras (6) no correspondieron con sus repeticiones homólogas. Las huellas génicas de las muestras 3CS, 6CS y 7CS no coincidieron con sus pares muestreados en el establecimiento de corte y deshuese ni con sus pares muestreados en los puntos de venta, mientras que las muestras 3CP1 y 3CP2 y 15CP2 no coincidieron con sus contrapartes del establecimiento de sacrificio y punto de venta y establecimiento de sacrificio y corte y deshuese, respectivamente.

Lo anterior sugiere varias posibilidades, como son: un mal manejo y marcado de los animales en el establecimiento de sacrificio y/o error en la toma de muestras y/o etiquetado de las mismas y/o error en la logística de producción y/o error experimental.

Los rangos de pares de bases esperados para los microsatélites empleados en el presente estudio para la raza Charolais de la Empresa A, correspondieron con lo reportado por (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2010), sin embargo existieron variaciones menores en los límites inferiores de detección para los microsatélites TGLA227 (79-99 pb) detectando de 77-99 pb; INRA23 (197-221 pb) detectando de 195-139 pb; ETH3 (117-129 pb) detectando de 113-125 pb y variaciones menores en el límite superior de detección para el microsatélite BM1824 (179-189 pb) detectando de 179- 190 pb.

En el caso de la Empresa B los rangos también coincidieron con los reportado por el mismo autor y por el ISAG y también presentaron variaciones menores en los límites inferiores de detección para los microsatélites TGLA227 (79-99 pb) detectando de 77-99 pb; TGLA122 (136-180 pb) detectando de 135-169 pb; INRA23 (197-221 pb) detectando de 196-215 pb y ETH3 (117-129 pb) detectando de 112-125 y variaciones menores en el límite superior de detección para el microsatélite BM1824 (179-189 pb) detectando de 179- 190 pb.

Lo anterior coincide en movilidad y talla de alelos con los encontrados en otras razas bovinas (Sanz *et al.*, 2002), así como con lo recomendado por la ISAG (Applied Biosystems, 2014).

Un ejemplo de un patrón de no correspondencia de diferentes muestras de un individuo, o sea la muestra de sangre no corresponde a la muestras de músculo en Proceso 1 y 2, lo que quiere decir que no son del mismo animal, se presenta en la Figura 11.

Los resultados del ajuste de valores extremos a cifras significativas para las muestras de la Empresa A y B se muestra en las Tablas 10 y 11, respectivamente.

10.7 Determinación de Número y Frecuencias Alélicas, Contenido de Información Polimórfica (PIC) y Heterocigosidad (He)

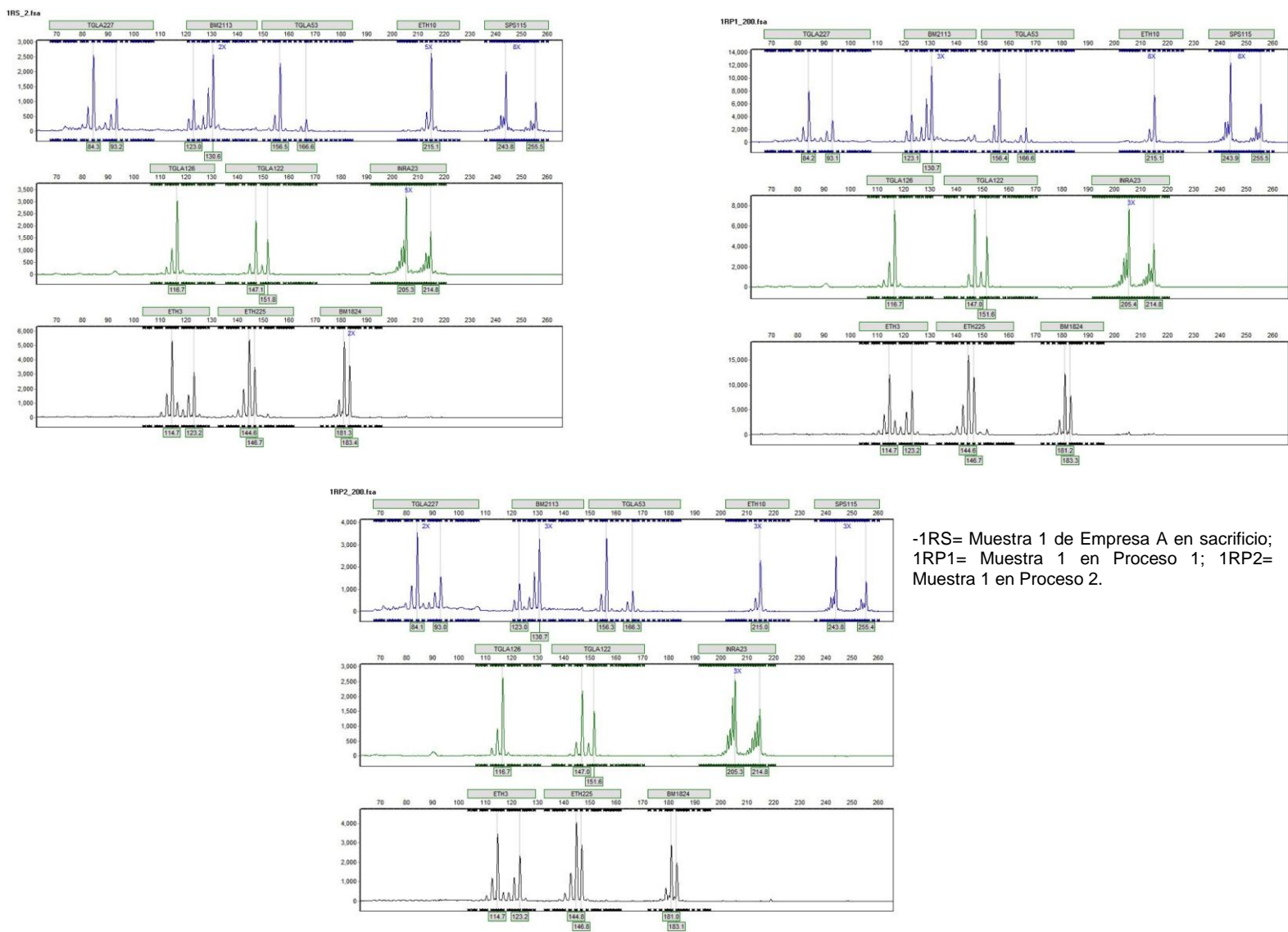
Se determinó para cada uno de los 11 microsatélites el número alélico y la correspondencia de homocigosis y/o heterocigosis por conteo directo.

Las Tablas 12 y 13 muestran los resultados de número y frecuencias alélicas, PIC y Heterocigosidad procesados a través del software Molkin V3.0 para la Empresa A y B, respectivamente. Así mismo muestran la Heterocigosidad media y el Contenido de Información Polimórfica medio de la población.

Los resultados obtenidos de PIC y He para la población de la Empresa A, indican que el microsatélite con menos cantidad de alelos es el BM1824 con 5 y el que presenta mayor cantidad de alelos es el INRA23 con 14, el microsatélite menos polimórfico es el ETH10 con el menor valor de PIC = 0.235 y He = 0.240, y el más polimórfico es el INRA23 con el valor más elevado de PIC = 0.862 y He = 0.873.

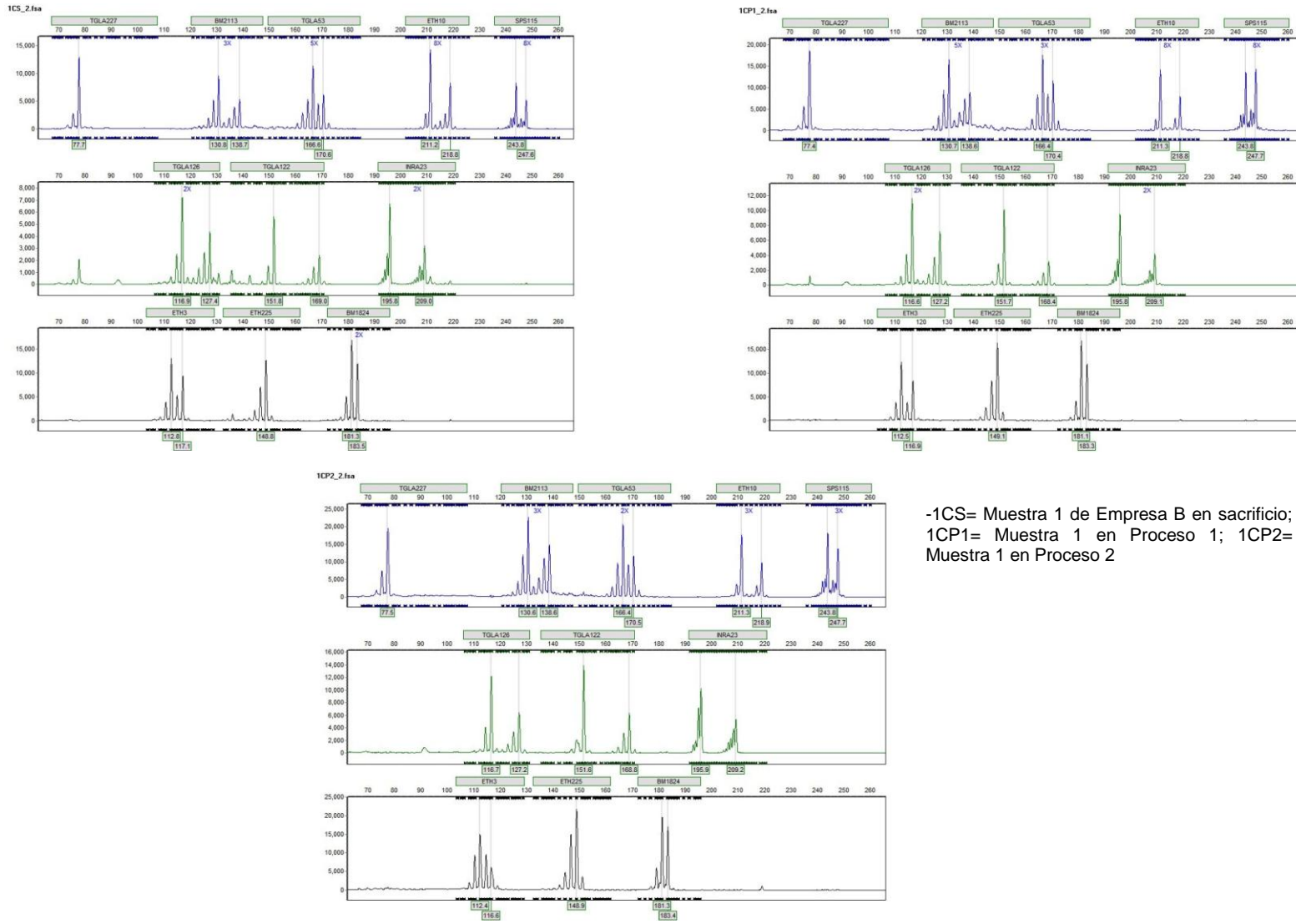
De acuerdo a los valores de He y PIC, todos los microsatélites analizados para la Empresa A son altamente polimórficos a excepción del ETH10, como ya se había mencionado (He y PIC <0.5); mientras que para la población de la Empresa B los 11 microsatélites son altamente polimórficos (He y PIC >0.5).

Figura 9. Electroferogramas de correspondencia de microsatélites en análisis de fragmentos por electroforesis capilar de muestras de la Empresa A



-1RS= Muestra 1 de Empresa A en sacrificio;
 1RP1= Muestra 1 en Proceso 1; 1RP2=
 Muestra 1 en Proceso 2.

Figura 10. Electroferogramas de correspondencia de microsátélites en análisis de fragmentos por electroforesis capilar de muestras de la Empresa B



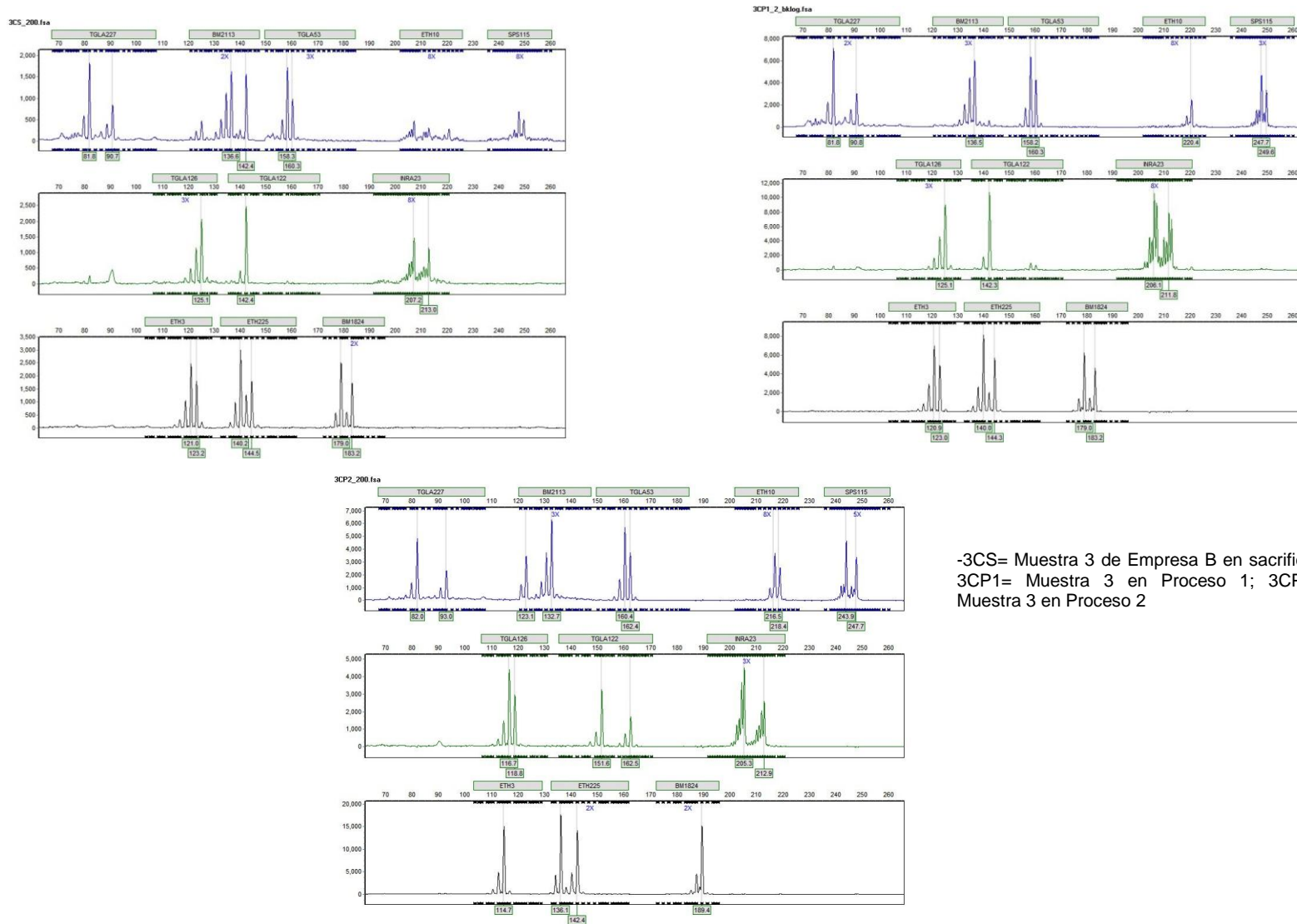
-1CS= Muestra 1 de Empresa B en sacrificio;
 1CP1= Muestra 1 en Proceso 1; 1CP2=
 Muestra 1 en Proceso 2

La fórmula para calcular el PIC considera el número de alelos presentes en cada locus y la frecuencia de dichos alelos, por lo tanto, los loci con un elevado número de alelos muestran valores mayores de PIC, aunque es posible encontrar valores menores de PIC aún cuando el número de alelos es elevado, si uno de estos predomina, como lo muestra el microsatélite TGLA 53 con un $PIC = 0.7358$ y una $He = 0.7576$ como se muestra en la Tabla 13.

Al comparar los valores de $PIC = 0.8140$ y $He = 0.8310$ reportados por (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2010) para el microsatélite INRA23 (el tercero más polimórfico de su estudio con 12 alelos), con los obtenidos en el presente estudio, encontramos que son muy similares en valores de PIC y He, sin embargo Rodríguez-Ramírez reportó que el microsatélite que arrojó los valores más elevados de PIC y Heterocigosidad fue el BM2113 (0.8420 y 0.8580, respectivamente).

Por otro lado, los resultados obtenidos de PIC y He para la población de la Empresa B, indican que el microsatélite con menos cantidad de alelos es el BM1824 con 6 alelos y el que presenta mayor cantidad de alelos es el BM2113 con 16 alelos, el microsatélite menos polimórfico es el SPS115 con el menor valor de $PIC=0.6041$ y $He=0.6294$, y el más polimórfico es el BM2113 con el valor más elevado de $PIC= 0.8868$ y $He=0.8951$.

Figura 11.- Electroferogramas donde no existe correspondencia de un mismo individuo comparando en pb por electroforesis capilar de muestras de la Empresa B



-3CS= Muestra 3 de Empresa B en sacrificio;
 3CP1= Muestra 3 en Proceso 1; 3CP2=
 Muestra 3 en Proceso 2

Tabla 10.- Pares de bases (pb) y alelos (homocigotos y heterocigotos) detectados por fluorescencia para las muestras colectadas de Empresa A

#	TGLA227 (79-99)	BM2113 (122-142)	TGLA53 (144-190)	ETH10 (207-225)	SPS115 (242-258)	TGLA126 (115-131)	TGLA122 (136-180)	INRA23 (197-221)	ETH3 (117-129)	ETH25 (133-157)	BM1824 (179-189)											
1RS	84	93	123	131	156	167	215	215	244	255	117	117	147	152	205	215	115	123	145	147	181	183
1RP1	84	93	123	131	156	167	215	215	244	255	117	117	147	152	205	215	115	123	145	147	181	183
1RP2	84	93	123	131	156	166	215	215	244	255	117	117	147	152	205	215	115	123	145	147	181	183
2RS	78	94	129	135	170	174	215	215	244	256	117	125	142	147	202	207	123	125	145	147	179	179
2RP1	78	93	129	135	170	174	215	215	244	256	117	125	142	147	202	207	123	125	145	145	179	179
2RP2	78	78	129	135	170	174	215	215	244	256	117	125	142	147	202	207	123	125	145	145	179	179
3RS	77	95	129	131	152	170	207	215	246	255	117	117	154	154	205	211	115	123	140	144	181	183
3RP1	82	93	131	139	166	166	215	215	250	250	117	117	142	152	205	209	115	119	140	144	179	181
3RP2	82	93	131	139	166	174	215	215	250	250	117	117	142	152	205	209	115	119	142	144	179	181
4RS	82	95	129	131	166	166	215	215	242	244	117	119	152	162	200	205	117	123	147	147	183	189
4RP1	82	95	129	131	166	166	215	215	242	244	117	119	152	162	200	205	117	123	147	147	183	189
4RP2	82	95	129	131	166	166	215	215	242	244	117	119	152	162	200	205	117	123	147	147	183	189
5RS	78	78	131	139	152	152	215	215	244	250	125	125	142	152	217	217	115	123	145	156	183	190
5RP1	84	93	129	131	162	166	215	215	244	251	116	116	143	152	205	213	114	123	145	147	181	181
5RP2	82	82	131	139	152	152	215	215	244	250	116	116	142	142	205	217	113	123	145	155	181	189
6RS	77	77	131	139	152	152	215	215	244	250	125	125	142	142	217	217	115	123	145	156	183	189
6RP1	77	77	131	139	152	152	215	215	244	250	125	125	142	152	217	217	115	123	145	156	183	189
6RP2	77	77	131	139	152	152	215	215	244	250	125	125	142	152	217	217	115	123	145	156	183	189
7RS	84	95	123	129	158	166	215	215	244	248	117	117	142	152	198	213	113	115	144	147	183	183
7RP1	84	95	123	129	158	166	215	215	244	248	117	117	142	152	198	213	113	115	145	147	183	183
7RP2	84	95	123	129	158	166	215	215	244	248	117	117	142	152	198	213	113	115	145	147	183	183
8RS	93	99	131	131	160	168	215	215	244	244	117	117	142	152	207	213	113	123	147	149	183	190
8RP1	93	99	131	131	160	168	215	215	244	244	117	117	142	152	207	213	113	123	147	149	183	190
8RP2	93	99	131	131	160	168	215	215	244	244	117	117	142	152	207	213	113	123	147	149	183	190
9RS	84	99	131	135	152	152	215	215	244	244	119	125	142	152	200	211	115	123	145	147	183	183
9RP1	84	99	131	135	152	152	215	215	244	255	119	125	142	142	200	211	115	123	145	147	183	183
9RP2	84	99	131	135	152	152	215	215	244	255	119	125	142	152	200	211	115	123	145	147	183	183
10RS	77	88	123	136	168	168	209	211	246	251	117	127	142	152	195	204	113	115	140	145	181	189
10RP1	77	82	129	135	162	166	215	215	244	250	117	117	152	152	200	205	115	115	140	144	183	183
10RP2	77	82	129	135	162	166	215	215	244	250	117	117	150	152	200	205	115	115	140	144	183	183
11RS	84	99	131	135	152	156	215	215	244	248	125	125	154	154	204	210	123	123	140	145	181	183
11RP1	84	99	131	135	152	156	215	215	244	248	125	125	154	154	205	211	123	123	140	145	181	183
11RP2	84	99	131	135	152	156	215	215	244	248	125	125	154	154	205	211	123	123	140	145	181	183
12RS	82	82	129	129	152	152	215	215	248	250	125	125	147	152	201	205	113	115	140	145	179	181
12RP1	82	82	129	129	152	152	215	215	248	250	125	125	147	147	201	205	113	115	140	145	179	181
12RP2	82	82	129	129	152	152	215	215	248	250	125	125	147	147	201	205	113	115	140	145	179	181
13RS	91	95	125	129	152	152	215	215	244	255	117	121	142	154	201	204	115	121	140	144	179	183
13RP1	91	95	125	129	152	152	215	215	244	255	117	121	142	154	201	205	115	121	140	144	179	183
13RP2	91	95	125	129	152	152	215	215	244	255	117	121	142	154	201	205	115	121	140	144	179	183
14RS	91	93	129	139	152	152	215	219	244	250	117	125	154	154	200	205	115	123	136	147	183	183
14RP1	91	93	129	139	152	168	215	219	244	250	117	125	154	154	200	205	115	123	136	147	183	183
14RP2	91	93	129	139	152	168	215	219	244	250	117	125	154	154	200	205	115	123	136	147	183	183
15RS	84	84	130	131	166	175	215	215	244	248	117	125	142	142	205	213	123	123	136	142	179	190
15RP1	82	93	129	135	152	152	208	217	244	244	119	123	140	142	209	209	113	123	145	156	179	183
15RP2	82	93	129	135	152	152	208	217	244	244	119	123	140	142	209	209	113	123	145	156	179	183
Control	84	95	123	131	158	162	213	219	244	255	119	121	140	142	213	213	117	117	136	136	179	183

Color amarillo= muestras que no coincidieron con sus contrapartes; Datos en casillas cerradas= homocigotos.

Tabla 11.- Pares de bases (pb) y alelos (homocigotos y heterocigotos) detectados por fluorescencia para las muestras colectadas de Empresa B

	TGLA227 (79-99)	BM2113 (122-142)	TGLA53 (144-190)	ETH10 (207-225)	SPS115 (242-258)	TGLA126 (115-131)	TGLA122 (136-180)	INRA23 (197-221)	ETH3 (117-129)	ETH225 (133-157)	BM1824 (179-189)											
1CS	77	77	131	139	167	171	211	219	244	248	117	127	152	169	196	209	113	117	149	149	181	183
1CP1	77	77	131	139	166	170	211	219	244	248	117	127	152	169	196	209	113	117	149	149	181	183
1CP2	77	77	131	139	166	170	211	219	244	248	117	127	152	169	196	209	112	117	149	149	181	183
2CS	77	82	131	131	162	162	211	215	244	244	123	125	135	142	207	213	115	115	136	147	179	183
2CP1	77	82	131	131	162	162	215	215	244	244	123	125	135	142	207	213	115	115	136	147	179	183
2CP2	77	82	131	131	162	162	211	214	244	244	123	125	135	142	207	213	115	115	136	147	179	183
3CS	82	93	136	142	158	158	220	220	248	250	125	125	142	142	207	213	121	123	140	144	180	183
3CP1	82	93	133	135	152	158	215	215	244	244	117	117	137	149	205	213	117	119	142	156	181	189
3CP2	82	93	123	133	160	162	216	218	244	248	117	119	152	162	205	213	115	115	136	142	189	189
4CS	84	99	127	129	152	158	215	219	244	244	119	123	140	143	205	213	115	123	145	147	179	183
4CP1	84	99	127	128	152	158	215	219	244	244	119	123	142	142	204	212	114	123	146	146	179	183
4CP2	84	99	127	129	152	158	215	215	244	244	119	123	142	142	205	214	115	123	147	147	179	183
5CS	84	91	133	135	158	166	207	215	244	250	117	117	142	142	213	213	115	125	136	147	181	183
5CP1	84	91	133	135	158	167	207	215	244	250	117	117	142	142	213	213	115	125	136	146	181	183
5CP2	77	93	123	131	182	182	215	217	248	248	123	125	142	152	198	215	115	115	147	156	183	183
6CS	91	99	129	138	168	170	217	221	242	255	117	119	140	142	207	215	115	115	145	145	179	181
6CP1	84	91	133	135	158	166	207	215	244	250	117	117	142	142	212	212	115	125	136	147	181	183
6CP2	84	91	132	134	158	166	207	215	244	250	117	117	142	142	212	212	114	125	136	147	181	183
7CS	80	84	127	133	158	168	217	219	244	256	120	126	152	152	205	205	115	115	156	156	179	181
7CP1	82	88	127	137	164	164	215	219	244	256	121	125	142	154	201	205	115	121	140	149	179	183
7CP2	82	89	127	137	164	164	215	219	244	256	121	125	142	154	201	205	115	121	140	149	179	190
8CS	80	95	124	131	182	184	215	217	248	248	124	126	142	152	198	205	115	115	147	156	183	183
8CP1	80	95	123	131	182	184	215	217	248	248	123	125	142	152	198	205	115	115	147	156	183	183
8CP2	77	95	123	131	182	184	215	217	248	248	123	125	142	152	198	205	115	115	147	156	183	183
9CS	77	82	137	139	158	168	217	217	244	255	119	125	152	152	205	207	115	115	151	156	179	179
9CP1	78	82	133	133	158	169	217	217	244	255	119	125	152	152	205	205	115	115	151	156	179	181
9CP2	78	82	127	132	158	169	217	219	244	255	119	125	152	152	205	205	114	114	151	156	179	181
10CS	84	93	125	133	158	166	215	215	244	255	117	119	142	152	205	209	115	123	136	136	179	183
10CP1	84	93	125	133	158	166	215	215	244	255	117	119	142	152	205	209	115	123	136	136	179	183
10CP2	84	93	125	133	158	166	215	215	244	255	117	119	142	152	205	209	115	123	136	136	179	183
11CS	82	99	131	132	158	158	217	219	244	244	117	119	135	152	205	213	117	119	156	156	183	183
11CP1	82	99	131	133	158	158	217	219	244	244	117	119	136	152	205	213	117	119	156	156	183	183
11CP2	82	99	131	133	158	158	217	219	244	244	117	119	135	152	205	213	117	119	156	156	183	183
12CS	77	93	125	136	168	168	215	217	244	244	117	125	151	151	207	215	117	119	142	147	189	189
12CP1	77	90	136	136	166	166	000	000	244	244	118	118	151	156	205	205	115	115	144	144	179	179
12CP2	77	91	137	139	166	168	215	217	244	244	119	119	152	156	205	207	115	115	142	144	179	179
13CS	91	91	131	133	158	162	211	215	244	246	123	123	152	152	201	201	113	115	136	156	179	181
13CP1	91	91	131	133	158	162	211	215	246	246	123	123	152	152	201	201	112	115	136	156	179	181
13CP2	91	91	131	133	158	162	211	215	244	246	123	123	152	152	201	201	113	115	136	156	179	181
14CS	78	90	132	136	168	168	215	217	246	250	117	125	151	152	200	204	117	117	140	144	182	189
14CP1	78	93	132	138	154	168	217	217	248	249	123	125	152	152	205	207	119	119	142	142	182	182
14CP2	78	93	125	137	169	169	215	217	244	244	117	125	152	152	207	215	117	119	142	147	190	190
15CS	82	93	129	134	152	152	207	217	244	244	119	123	140	142	209	209	112	123	145	156	179	183
15CP1	82	93	129	135	152	152	208	217	244	244	119	123	140	142	209	209	112	123	145	156	179	183
15CP2	82	93	129	135	152	152	207	217	244	244	119	123	140	142	209	209	112	123	145	156	179	183
Control	84	95	123	130	158	162	213	219	244	255	119	121	140	142	213	213	117	117	136	136	179	183

Color amarillo= muestras que no coincidieron con sus contrapartes; Datos en casillas cerradas= alelos homocigotos; Muestra 12CP1 sin detección de fluorescencia.

Tabla 12.- Frecuencias alélicas, PIC, PIC medio, He y He media para la raza Charolais de Empresa A

No. alelos	TGLA 227	BM 2113	TGLA 53	ETH 10	SPS 115	TGLA 126	TGLA 122	INRA 23	ETH 3	ETH225	BM 1824
Alelo 1	0.11	0.09	0.43	0.01	0.03	0.04	0.03	0.01	0.14	0.07	0.2
Alelo 2	0.07	0.03	0.07	0.02	0.49	0.46	0.34	0.03	0.01	0.15	0.17
Alelo 3	0.18	0.29	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.13	0.33	0.02	0.49
Alelo 4	0.17	0.01	0.03	0.01	0.12	0.09	0.12	0.05	0.05	0.09	0.09
Alelo 5	0.01	0.32	0.04	0.01	0.18	0.04	0.01	0.03	0.02	0.32	0.05
Alelo 6	0.07	0.14	0.18	0.87	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.25	
Alelo 7	0.16	0.01	0.02	0.02	0.11	0.33	0.18	0.26	0.38	0.03	
Alelo 8	0.01	0.11	0.08	0.04	0.03	0.01	0.03	0.07	0.03	0.01	
Alelo 9	0.12		0.04					0.07		0.07	
Alelo 10	0.10		0.04					0.01			
Alelo 11			0.01					0.07			
Alelo 12								0.11			
Alelo 13								0.03			
Alelo 14								0.10			
He	86.46	77.39	75.76	24.05	69.78	67.32	76.18	87.33	72.33	79.73	68.17
PIC (%)	84.95	74.06	73.58	23.55	66.52	62.12	72.48	86.25	67.94	77.06	64.01
He media (%)		67.15									
PIC medio (%)		64.49									

No. de loci= 11

(n=45)

Tabla 13.- Frecuencias alélicas, PIC, PIC medio, He y He media para la razas sintéticas de Empresa B

No. alelos	TGLA 227	BM 2113	TGLA53	ETH 10	SPS 115	TGLA 126	TGLA 122	INRA 23	ETH 3	ETH225	BM 1824
Alelo 1	0.17	0.06	0.11	0.07	0.01	0.01	0.06	0.01	0.07	0.19	0.31
Alelo 2	0.06	0.01	0.01	0.01	0.02	0.26	0.01	0.03	0.04	0.04	0.19
Alelo 3	0.03	0.06	0.27	0.01	0.58	0.02	0.01	0.04	0.04	0.08	0.02
Alelo 4	0.18	0.08	0.02	0.11	0.06	0.22	0.06	0.09	0.47	0.07	0.39
Alelo 5	0.12	0.01	0.01	0.02	0.15	0.01	0.34	0.02	0.10	0.08	0.06
Alelo 6	0.02	0.07	0.04	0.34	0.01	0.02	0.01	0.3	0.09	0.03	0.03
Alelo 7	0.01	0.21	0.13	0.01	0.06	0.21	0.01	0.11	0.03	0.17	
Alelo 8	0.01	0.07	0.02	0.24	0.01	0.01	0.04	0.13	0.11	0.09	
Alelo 9	0.15	0.15	0.10	0.01	0.07	0.17	0.35	0.06	0.04	0.02	
Alelo10	0.14	0.02	0.04	0.14	0.03	0.02	0.02	0.15		0.23	
Alelo 11	0.02	0.07	0.03	0.02		0.04	0.03	0.01			
Alelo 12	0.08	0.06	0.01	0.01			0.01	0.03			
Alelo 13		0.06	0.06				0.03				
Alelo 14		0.02	0.03								
Alelo 15		0.06									
Alelo 16		0.01									
He (%)	86.9 1	89.51	86.59	78.90	62.94	80.91	74.35	83.98	74.05	85.41	71.16
PIC (%)	85.5 1	88.68	85.37	76.18	60.41	78.22	70.77	82.33	72.09	83.79	66.20
He media (%)			77.10								
PIC medio (%)			74.87								

No. de loci= 11

(n=45)

Los valores de He y PIC del microsatélite BM2113 de igual manera fueron comparados con los valores reportados por (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2010) siendo consistentes con los mismos (PIC= 0.8420 y He= 0.8580), lo que nos indica que el marcador BM2113 es el que provee mayor información polimórfica para las razas sintéticas multirraciales del estado de Sonora.

La He media nos indica la medida de la variable genética de una población, su valor varía entre 0 y 1 y se maximiza cuando varios alelos poseen frecuencias similares. El PIC medio nos indica el grado de variabilidad de todos los microsatélites empleados en esa población específica. En este sentido podemos afirmar que la población de la Empresa B (razas sintéticas multirraciales), He media=0.7710 y PIC medio= 0.7487, presenta mayor variabilidad con respecto a la población de Empresa A (raza Charolais), He media=0.6715 y PIC medio= 0.6449, aún cuando la población de la Empresa A presenta una mayor cantidad de alelos iguales u homocigosis.

10.8 Determinación de la Probabilidad de Correspondencia y Capacidad de Exclusión

En pruebas de paternidad, la utilidad de cualquier marcador co-dominante, como lo son los microsatélites, está definida por su probabilidad de hacer una exclusión.

De tal manera que, asumiendo la ausencia de parentesco entre individuos, la probabilidad de que dos muestras distintas sean iguales, en el caso de la Empresa A para la población de ganado Charolais, fue de 2.974×10^{-10} %, con una capacidad de exclusión calculada (%) de 99.99, tomando en cuenta el panel completo de 11 microsatélites, como se muestra en la Tabla 14.

El valor obtenido de capacidad de exclusión, concuerda con lo reportado por (Rodríguez-Ramírez, 2010) para el panel de 11 microsatélites, (capacidad de exclusión= 99.99 % y probabilidad de correspondencia de 1.149×10^{-11}), sin embargo la probabilidad de correspondencia fue mayor en las dos poblaciones del presente estudio.

La probabilidad de correspondencia o MP para el panel completo de 11 microsatélites de la población de razas sintéticas de la Empresa B fue de 1.74×10^{-12} ó %, con una capacidad de exclusión de 99.99 %, como se muestra en la Tabla 15, lo cual es consistente con los reportado por (Rodríguez-Ramírez, 2010).

Tabla 14.- Probabilidad de Correspondencia (MP) para la raza Charolais de la Empresa A

Microsatélite	No.	p(1)	p(2)	p(3)	p(4)	p(5)	p(6)	p(7)	p(8)	p(9)	p(10)	p(11)	p(12)	p(13)	p(14)
TGLA227	10	0.108	0.065	0.184	0.173	0.010	0.065	0.163	0.010	0.119	0.097				
BM2113	8	0.087	0.032	0.293	0.010	0.315	0.141	0.010	0.108						
TGLA53	11	0.434	0.065	0.043	0.032	0.043	0.184	0.021	0.076	0.043	0.043	0.010			
ETH10	8	0.010	0.021	0.010	0.010	0.010	0.869	0.021	0.043						
SPS115	8	0.032	0.489	0.010	0.119	0.184	0.021	0.108	0.032						
TGLA126	8	0.043	0.456	0.010	0.087	0.043	0.021	0.326	0.010						
TGLA122	8	0.032	0.337	0.010	0.119	0.010	0.021	0.184	0.032						
INRA23	14	0.010	0.032	0.130	0.054	0.032	0.032	0.260	0.065	0.065	0.010	0.065	0.108	0.032	0.097
ETH3	8	0.141	0.010	0.326	0.054	0.021	0.032	0.380	0.032						
ETH225	9	0.065	0.152	0.021	0.087	0.315	0.250	0.032	0.010	0.065					
BM1824	5	0.195	0.173	0.489	0.087	0.054									

(n=45)

Asumiendo ausencia parentesco:

Probabilidad 2 muestras distintas sean iguales (%)= 2.97×10^{-10}

Capacidad de exclusión (%)= 99.99

Tabla 15.- Probabilidad de Correspondencia (MP) para las razas sintéticas de la Empresa B

Microsatélite	No.	p(1)	p(2)	p(3)	p(4)	p(5)	p(6)	p(7)	p(8)	p(9)	p(10)	p(11)	p(12)	p(13)	p(14)	p(15)	p(16)
TGLA227	12	0.166	0.055	0.033	0.177	0.122	0.022	0.011	0.011	0.155	0.144	0.022	0.077				
BM2113	16	0.055	0.011	0.055	0.077	0.011	0.066	0.211	0.066	0.155	0.022	0.066	0.055	0.055	0.022	0.055	0.011
TGLA53	14	0.111	0.011	0.266	0.022	0.011	0.044	0.133	0.022	0.100	0.044	0.033	0.011	0.055	0.033		
ETH10	12	0.068	0.011	0.011	0.113	0.022	0.340	0.011	0.238	0.011	0.136	0.022	0.011				
SPS115	10	0.011	0.022	0.577	0.055	0.155	0.011	0.055	0.011	0.066	0.033						
TGLA126	11	0.011	0.255	0.022	0.222	0.011	0.022	0.211	0.011	0.166	0.022	0.044					
TGLA122	13	0.055	0.011	0.011	0.055	0.344	0.011	0.011	0.044	0.355	0.022	0.033	0.011	0.033			
INRA23	12	0.011	0.033	0.044	0.088	0.022	0.300	0.111	0.133	0.055	0.155	0.011	0.033				
ETH3	9	0.066	0.044	0.044	0.466	0.100	0.088	0.033	0.111	0.044							
ETH225	10	0.188	0.044	0.077	0.066	0.077	0.033	0.166	0.088	0.022	0.233						
BM1824	6	0.311	0.188	0.022	0.388	0.055	0.033										

(n=45)

Asumiendo ausencia parentesco:

Probabilidad 2 muestras distintas sean iguales (%)= 1.74×10^{-12}

Capacidad de exclusión (%)= 99.99

XI. VERIFICACIÓN DEL SISTEMA DE TRAZABILIDAD IMPLEMENTADO

Mientras que el punto más crítico de la trazabilidad en el proceso de sacrificio se encuentra entre el noqueo y el desangrado, ya que la identificación original del animal es removida en este punto y es reemplazado por un marcaje de tinta grado alimenticio, el punto más crítico de la trazabilidad en las salas de corte y deshuese, se sitúa al momento de armar los pedidos y empacarlos porque un pedido puede estar armado con piezas de uno o más animales.

En los puntos de venta, los códigos de barras generados al empacar los pedidos en las salas de corte y deshuese, se pueden o no mantener hasta la venta del producto al público, dependiendo del destino de las piezas dentro de las tiendas, es decir, los puntos de venta pueden generar otro código de barras en caso de que las piezas sean destinadas al empaque individual con valor agregado.

En todos los procesos involucrados en la producción de carne con fines de exportación (transporte, faenado, despiece, corte, deshuese, empaque y venta al público), los registros, aretes, números individuales, códigos de barras y demás documentos oficiales, deben ser resguardados y mantenidos a disposición de la SAGARPA por 5 años para fines de auditoría. (Ley Federal de Sanidad Animal, 2012).

Al confirmar la identidad del 91.12% de los individuos de la Empresa A y del 86.67% de la Empresa B muestreados a lo largo de las etapas de sacrificio, corte y deshuese y venta directa al público, se verificó la compatibilidad y complementación entre los sistemas de identificación y trazabilidad implementados en las tres plantas TIF ya que los parámetros de genética poblacional propuestos muestran >99.99% de confiabilidad. De tal manera que se puede afirmar que el sistema de trazabilidad molecular propuesto es confiable y se puede implementar de manera inmediata.

El método de identificación basado en el polimorfismo del ADN, representa una excelente herramienta para la verificación de sistemas de identificación animal que ha sido adoptado por plantas de proceso en diferentes países del mundo ya que consideran un alto porcentaje de confiabilidad (>99.99 %).

A través del presente trabajo de investigación, y bajo las condiciones antes mencionadas, se demostró que la técnica puede identificar muestras del mismo animal con absoluta certeza durante diferentes etapas de proceso, demostrando el poder de la tecnología implementada con el fin de certificar los sistemas de trazabilidad convencionales que actualmente se encuentran implementados en plantas en todo el país, ya que la trazabilidad representa un elemento muy importante en el control de calidad.

Para la aplicación práctica de este sistema, las muestras a evaluar, deben ser obtenidas implementando un muestreo aleatorio en diferentes puntos de la cadena de producción, desde el desangrado de los animales, las canales en los rastros, piezas en salas de corte y deshuese, hasta los empaques individuales en puntos de venta final.

El método a implementar, permite de manera inicial obtener muestras de sangre de manera conveniente y económica ya que el muestreo lo puede realizar el personal del establecimiento y/o el personal coadyuvante de la SAGARPA al mismo tiempo que se identifican los animales con el número interno asignado por el establecimiento. Las muestras pueden ser fácilmente

guardadas en el establecimiento bajo resguardo del MVO y enviadas al laboratorio de referencia para su posterior análisis. En el caso de las contra-muestras, el muestreo puede ser llevado a cabo directamente por el personal de la planta de corte y deshuese o por el personal de control de calidad que haya sido asignado específicamente para ese fin ya que no requiere de cambios importantes en los procedimientos de operación ya identificados.

La implementación del sistema es una importante contribución al sector ganadero del país ya que asegura la calidad de los productos como herramienta de certificación de la trazabilidad convencional, esto incrementa la competitividad del sector y genera gran confianza por parte de los consumidores nacionales e internacionales que constantemente demandan garantía de calidad de los productos que adquieren.

Debido a que los tres establecimientos TIF seleccionados para realizar la implementación del sistema de trazabilidad molecular se encuentran autorizados para exportar a EUA y que el Código Federal de Regulación 9 (CFR por sus siglas en inglés) en su numeral 417 referente al HACCP menciona que el mismo debe contar con un sistema de trazabilidad implementado para poder ubicar los productos en cualquiera de las etapas de proceso hasta su comercialización, que el sistema debe estar validado a través de ejercicios de recuperación de producto (Recalls) y que los mismos deben responder ante la autoridad en un plazo máximo a 2 hrs, se llevó a cabo la validación del sistema de trazabilidad molecular a través de ejercicios de recuperación obteniendo un empate mayor al 99 %.

XII. CONCLUSIONES

Se estandarizaron las condiciones y parámetros para realizar la genotipificación por marcadores STR's para el ganado de exportación de la empresa A (raza Charolais) y empresa B (razas sintéticas multirraciales).

El sistema molecular propuesto fue confiable para la correcta identificación de las muestras lo que garantizó la ubicación de la carne través de toda su cadena productiva.

Los microsatélites que arrojaron la mayor cantidad de información polimórfica para las muestras de ambas razas fueron: BM2113, INRA23, TGLA53, TGLA227 y ETH225 además de ser los que presentaron la mayor capacidad de exclusión. En base a lo anterior el uso de estos 5 micorsatélites en lugar del panel de 11, podría ser viable para ser usados con fines de trazabilidad molecular.

XIII. REFERENCIAS

Arana A., Soret B., Lasa I. y Alfonso L. 2002. Meat traceability using DNA markers: Application to the beef industry. *Meat Science*. 61(4):367-373.

Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M., Shalom A., Kirkpatrick B.W., Ryan A.M., Clayton D., Li L., Neibergs H.L., Zhang N., Grosse W.M., Weiss J., Creighton P., McCarthy F., Ron M., Teale A.J., Fries R., McGraw R.A., Moore S.S., Georges M., Soller M., Womack J.E. y Hetzel D.J.S. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *National Genetics* 6:227-235.

Barrera-Saldaña H., Ortíz-López R., Rojas-Martínez A. y Reséndez D. 1993. Reacción en la cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada de la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo Conacyt*. 18 (108):50-60.

Bonilla C., Rubio MS., Sifuentes AM., Parra-Bracamonte GM., Arellano V., Méndez M., Berruecos J. y Ortíz R. 2010. Association of CAPN1 316, CAPN1 4751 and TG5 markers with bovine meat quality traits in México. *Genetics and Molecular Research*. 9(4): 2395-2405.

Botstein D., White R., Skolnick M. y Davis R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.

Caja G., Conill C. y Garín D. 2000. Identificación electrónica aplicada a la trazabilidad del ganado porcino. *Solo Cerdo Ibérico*.

Capoferri R., Galli A., y Bongioni G. 2005. Molecular traceability in meat producing animals by SNPs. In 4th World Italian Beef Cattle Congress. Italy.

Castagnino M.J. 1999. Electroforesis capilar. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. Vol. XXXIII, No. 3, 297-329.

Chávez R., Felmer R., Catrileo A., Sagredo B., Iraira S. y Folch C. 2004. Evaluación de microsátélites bovinos para la implementación de un sistema de trazabilidad molecular de la carne bovina. XXIX Reunión Anual de SOCHIPA, Villarrica. 13-15 de octubre de 2004:151-152.

Ciampolini R., Moazami-Goudarzi K., Vaiman D., Dillman C., Mazzanti E., Foulley JL., Leveziel H. y Cianci D. 1995. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *J. Anim. Sci.* 73(11):3259-68.

Council of the European Communities. 2000. Establishing a system for the identification and registration of bovine animals and regarding the labelling of beef and beef products. Regulation (EC) No. 1760/2000 of the European Parliament and the Council of 17 July 2000. *Off. J. Eur. Commun.* 31: 1-24.

Conill C., Caja G., Nehring R., y Ribó O. 2000. Effects of injection position and transponder size on the performances of passive injectable transponders used for the electronic identification of cattle. *Journal of Animal Science.* 78(12): 3001-3009.

Cunningham E. y Meghen C. 2001. Biological identification systems: genetic markers. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20(2): 491-499.

Dalvit C., De Marchi M. y Cassandro M. 2007. Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science.* 77(4): 437-449.

De Mello M. 2000. Effects of traceability on the brazilian beef agribusiness system. *Universidad Federal de Sao Carlos. CEP.* 13: 565-905.

Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera. 2008. Manual para la inspección sanitaria en establecimientos de sacrificio TIF. Revisión 1. SENASICA-SAGARPA. México, D.F. pp. 30.

Estévez C. 2009. Estudio sobre la caracterización genética de las razas caprinas Malloruina e Ibicenca. Tesis para obtener el grado de Master en Zootecnia y Gestión Sostenible. Córdoba, España. Universidad de Córdoba. 8 p.

Eckert, K. A. y Hile, S. E. 2009. Every microsatellite is different: Intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome. *Molecular Carcinogenic*, 48: 379–388. doi: 10.1002/mc.20499.

FAO. Comission on genetic resources for food and agriculture. Working Group on Animal genetics resources for food and agriculture. Rome: Third Session; 2004.

Felmer R., Catrileo A. y Rojas C. 2006. Tecnologías actuales y emergentes para la identificación animal y su aplicación en la trazabilidad animal. Arch. Med. Vet., 38: 197-206.

Felmer R., Chávez R., Iraira S., Folch C., Parra L., Catrileo A., y Ortíz M. 2008. Implementación de un sistema molecular para trazabilidad de carne basada en marcadores microsatélites. Chilean Journal of Agricultural Research. 64: 324-351.

Fernández M., Goszczynski D., Lirón J., Villegas-Castagnasso E., Carino M., Ripoli M., Rogberg-Muñoz A., Posik D., Peral-García P. y Giovambattista G. 2013. Comparison of the effectiveness of microsatellites and SNP panels for genetic identification, traceability and assessment of parentage in an inbred Angus herd. Genetics and Molecular Biology. 36(2): 185-191.

Fernández R. 2002. Trazabilidad alimentaria. Una herramienta decisiva para la seguridad y la protección de los consumidores. Distribución y Consumo. 62: 5-10.

Filippini G., Cetica V., Ciampolini R., Biagetti M., Cecchi F. y Mazzanti E. 2006. Beef traceability using molecular methodologies. Veterinary Research Communications. 30(1): 375-377.

Gutiérrez J.P., Royo L.J., Álvarez I., Goyache F. 2005. Molkin V2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. Journal of Heredity. 96 718:721.

Horsburgh K., Prost S., Gosling A., Stanton J., Rand C. y Matisoo-Smith E. 2013. The Genetic Diversity of the Nguni Breed of African Cattle (*Bos* spp.): Complete Mitochondrial Genomes of Haplogroup T1. PloS one 8(8): e71956.

Kozubska-Sobocinska A., Radko A., Rejduch B., Slota E. 2008. Genetic conservation of Y chromosome based on microsatellite sequences in some species of *bovidae*. Ann. Anim. Sci., Vol. 8, No. 3 249-254.

Kubista M., Andrade J., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K. y Zoric N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine. 27(2): 95-125.

Lacadena J.R. 1981. Genética. 3ª Edición. A.G.E.S.A. Madrid.

Ley Federal de Sanidad Animal y su Reglamento. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos. México, D.F., 25 de Julio de 2007. pp. 45-88.

López Daniel. 2000. La formación de razas compuestas. Sumario Ganadero. 3(3):74-77.

Negrini R., Nijman I.J., Milaresi E., Moazani-Goudarzi K., Williams J.L., Erhardt D.G., Dumer S., Rodellar C., Valentini A., Bradley D.G., Ajmone-Marsan P., Leastra J.A. and The European Cattle Genetic Diversity Consortium. 2007. Differentiation of european cattle by AFLP fingerprinting. Anim. Genet. 38, 60-66.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. 70:3321-3323.

Orrú L., Napolitano F., Castillo G. y Moiola B. 2006. Meat molecular traceability: How to choose the best set of microsatellites. Meat Science. 72:312-317.

Ortega J. y García L. 2011. El genoma bovino, métodos y resultados de su análisis. Revista MVZ Córdoba. Vol. 16. 1:2410-2424.

Pettitt R. 2001. Traceability in the food animal industry and supermarket chains. Science Technology. 20: 584-597.

Riojas-Valdés V., Gómez de la Fuente J.C., Salinas J., Montes de Oca R. y Wong A. 2006. Confiabilidad del análisis de ADN en pruebas de paternidad para bovinos Brahman y Brangus en México. Ciencia UANL. IX.1:41-50.

Rodríguez I. y Barrera H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL. Vol. VII. No. 3.

Rodríguez-Ramírez R., Arana A., Alfonso L., González-Córdova A.F., Torrescano G., Legarreta I.G. y Vallejo-Cordoba B. 2011. Molecular traceability of beef from synthetic mexican bovine breeds. Genetics and Molecular Research Oct. 6. 10(4):2358-65.

Rodríguez-Ramírez R., González-Córdova A.F., Arana A., Sánchez-Escalante A. y Vallejo-Cordoba B. 2010. Trazabilidad de la carne de bovino: conceptos, aspectos tecnológicos y perspectivas para México. Interciencia, 35: 746-751.

Sanz A., Uffo O., Miranda I. y Martínez S. 2002. Empleo de los microsatélites para determinar paternidad en bovinos cubanos. Revista Salud Animal. Vol. 24 No. 3: 166-169.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-009-ZOO-1994 Proceso sanitario de la carne. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos. México, D.F. 16 de noviembre de 1994. pp.63.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-024-ZOO-1995 Especificaciones y características zoonosológicas para el transporte de animales, sus productos y subproductos, productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos. México, D.F. 16 de octubre de 1995. pp.46.

Schwägele F. 2005. Traceability from a European perspective. *Meat Science*. 71(1): 164-173.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1994 Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos. México, D.F. 07 de julio de 1995. pp.17.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995 Trato humanitario en la movilización de animales. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos. México, D.F. 23 de marzo de 1998. pp.67.

Secretaría de Agricultura y Ganadería. 1952. Reglamento para la industrialización sanitaria de la carne. Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos. México, DF. 13 de febrero de 1950. pp 50.

Serra J. y Godoy P. 2000. Incidencia , etiología y epidemiología de la brucelosis en un área rural de la provincia de Lleida. *Revista Especializada en Salud Pública*. 74:45-53.

Shackell G., Tate M. y Anderson R. 2004. Installing a DNA-based traceability system in the meat industry. *Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed Genet*. Vol. 12: 533-535.

Sofos J. 2008. Challenges to the meat safety in the 21st century. *Meat Sci.*, 78: 3-13.

Technical Manual. 2014. Wizard Genomics DNA Purification Kit. Promega Corporation. Applied Biosystems Co., Madison Wi. TM050 Revised 12/14.

User Guide. Applied Biosystems. 2009. DNA fragment analysis by capillary electrophoresis. Applied Biosystems Co., Publication No. 4474504. Revision A. Life Technologies. 2012.

User Guide. StockMarks® Kits for Horses, Cattle and Dogs; Equine, Bovine, and Canine Genotyping Kits. Publication No. 4346135. Revision F. Life Technologies. 2014. 26-28).

Vázquez J., Pérez T., Ureña F., Gudín E., Albornoz J. y Domínguez A. (2004). Practical application of DNA fingerprinting to trace beef. *Journal Food Protection*. 67(5):972-979.

Wan, Q.-H., Wu, H., Fujihara, T. y Fang, S.-G. (2004), Which genetic marker for which conservation genetics issue?. *Electrophoresis*. 25: 2165–2176. doi: 10.1002/elps.200305922.

Weir, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis 2: Methods for discrete population genetic data*. 2ª Edición. University of Washington.

Yordanov D. y Angelova, G. 2006. Identification and traceability of meat and meat products. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 20:3-8.

Zarringhabaie G. E., Pirany N. y Javanmard A. 2011. Molecular traceability of the species origin of meats using multiplex PCR. *African Journal of Biotechnology*. 10(73): 16461-16465.