

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA**



**DETERMINACION DEL NUMERO DE VARIANTES Y  
FRECUENCIAS GENICAS DE 8 MICROSATELITES  
DE ADN EN LAS RAZAS BOVINAS BRAHMAN  
Y BRANGUS EN EL NORESTE DE MEXICO**

**POR**

**JUAN CARLOS GOMEZ DE LA FUENTE**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS**  
con Especialidad en Producción Animal.

**Noviembre, 2001**

1976

1977

1978

1979

1980

1981

1982

1983

1984

1985

1986

1987

1988

1989

1990

1991

1992

1993

DETERMINACIÓN DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GENÉTICAS

DE TERAPIAS ANTIBIÓTICAS EN LAS COMUNIDADES

INDÍGENAS DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA

SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS

DE LA SIERRA DE LAS RAZAS EN LA SIERRA DE LAS RAZAS



1080094997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA



DETERMINACION DEL NUMERO DE VARIANTES Y  
FRECUENCIAS GENICAS DE 2 MICROSATELITES  
DE ADN EN LAS RAZAS BOVINAS BRAHMAN  
Y BRANGUS EN EL NORESTE DE MEXICO

POR

JUAN CARLOS GOMEZ DE LA FUENTE

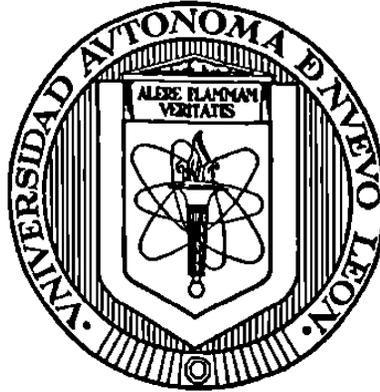
Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
con Especialidad en Producción Animal.

Noviembre, 2001

TM  
SF756.05  
.G6  
c-1



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS  
GÉNICAS DE 8 MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS  
BOVINAS BRAHMAN Y BRANGUS  
EN EL NORESTE DE MÉXICO**

**Por**

**JUAN CARLOS GÓMEZ DE LA FUENTE**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
con Especialidad en Producción Animal.**

**Noviembre, 2001**

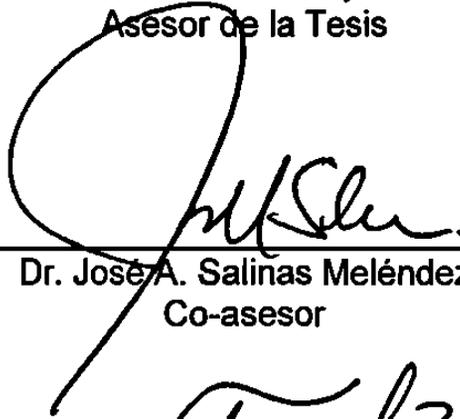
**DETERMINACIÓN DEL NUMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS  
GÉNICAS DE 8 MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS  
BOVINAS BRAHMAN Y BRANGUS  
EN EL NORESTE DE MÉXICO**

**APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE TESIS:**



---

**Ph.D Víctor Manuel Riojas Valdés**  
Asesor de la Tesis



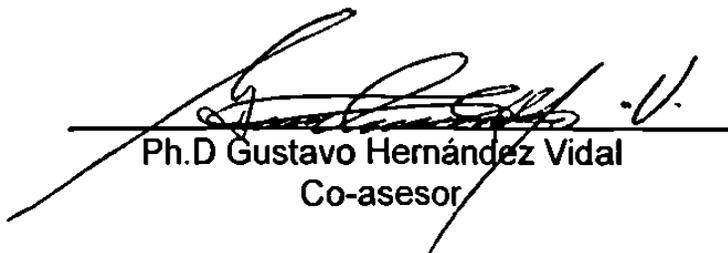
---

**Dr. José A. Salinas Meléndez**  
Co-asesor



---

**Dr. Roberto Montes de Oca Luna**  
Co-asesor



---

**Ph.D Gustavo Hernández Vidal**  
Co-asesor

**DETERMINACIÓN DEL NUMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS  
GÉNICAS DE 8 MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS  
BOVINAS BRAHMAN Y BRANGUS  
EN EL NORESTE DE MÉXICO  
APROBACIÓN DE LA TESIS**

---

Ph.D Víctor Manuel Riojas Valdés  
Presidente

---

Dr. José Antonio Salinas Meléndez  
Secretario

---

Ph.D Gustavo Hernández Vidal  
Vocal

---

Dr. Alfredo Wong González  
Secretario de Post-grado e Investigación

## **DEDICATORIA**

**A mis padres, que me enseñaron con su ejemplo de fortaleza a emprender cualquier proyecto en la vida con perseverancia, dedicación y esfuerzo sin importar las dificultades que esto implique.**

**A mi esposa Martha Leticia por su amor y entendimiento al apoyarme en los momentos difíciles que se presentaron durante el transcurso de esta investigación.**

**A mis hijas Keren y Karla, por comprender mi ausencia durante estos años que duró mi investigación, espero que este sacrificio por mi superación profesional que implicó no estar con ellas, las impulse a seguir siendo excelentes estudiantes.**

**A mis hermanos Iván, Edna, Idalia, Luis, Francisco y Ramiro que en todo momento me apoyaron, comprendieron y estimularon a seguir adelante.**

**A mi abuelita Francisca que en todo momento estuvo pendiente de mí y mi familia.**

**A mis alumnos y tesistas que me permitieron colaborar en su formación con mi humilde participación, confiando que darán continuidad a este tipo de investigación y la perfeccionarán.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo la ayuda, conducción y compañía de cada una de las personas que a continuación menciono.

Al Dr. Víctor M. Riojas Valdés por su enseñanza y asesoría principal en esta investigación, especialmente por ser un amigo que en todo momento me apoyó, logrando formar en mí el interés por la investigación.

Al Dr. José Antonio Salinas Meléndez, por su confianza depositada en mí, por su incondicional apoyo y sobre todo su invaluable amistad, espero no haberle fallado, mil gracias Doc.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por su asesoría y orientación en la presente investigación, por su confianza y amistad como buen paisano.

Al Dr. Gustavo Hernández Vidal por su asesoría y consejos para la realización de esta tesis.

Al Dr. Alfredo Wong González por su valiosa colaboración en las correcciones de esta Tesis.

Al Dr. José González Salinas, por ser un maestro compañero y amigo, con quien siempre aprendí nuevas ideas y conceptos.

Al Ing. Ciro Efrén Barrera Hinojosa por su asesoría en la definición de la aplicación de fórmulas estadísticas en esta investigación, gracias Maestro.

A la Secretaría de Educación Pública del Estado de Tamaulipas y el S.N.T.E. Sección 30 por darme la oportunidad de superarme, especialmente al Prof. Luis Humberto Hinojosa, al Dip. Fed. Enrique Meléndez y mi compañero de lucha Prof. Antonio Rocha Lara.

A los socios Ganaderos de la U.G.R.T. y U.G.R.N.L., que me ayudaron con la donación de las muestras.

A cada uno de mis maestros de Post-grado, que tuvieron paciencia conmigo y forjaron en mi un carácter emprendedor.

Al MVZ José María por su amistad y consejos siempre oportunos, gracias Chema por todo tu apoyo.

Especialmente a mis hermanos: Idalia por ser un ejemplo a seguir como Investigador Universitario, Edna por su incondicional apoyo durante toda mi estancia en el Post-grado así como su asesoría en la impresión y preparación de mi tesis, Iván (Mi'jo el mayor) por ser compañero y cómplice de mil sucesos.

**A mi cuñada Gabby que le tocó soportarme al final de todo esto.**

**A mis suegros que tuvieron a mis hijas bajo su cuidado durante mi ausencia, mil gracias por ser excelentes suegros.**

**A los auxiliares de Laboratorio, que me ayudaron y fueron mis cómplices en esta investigación, Melissa, Whitty, Jorge, Fernanda, Pony, Coca, Morelos, Toño, Pollo, Alicia y Damaris.**

**A todos y cada uno de los que integraron el Departamento de Postgrado, durante mi estancia con ustedes.**

**A mis compañeros de trabajo en la Facultad, que de una forma u otra me brindaron su apoyo y amistad.**

**A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia como Institución por adoptarme al formar parte de ella y darme la oportunidad de realizar mi investigación.**

# TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN . . . . .	1
1.1 Genealogía. . . . .	1
1.2 Métodos Tradicionales de Identificación. . . . .	2
1.2.1 Descripción Fenotípica . . . . .	2
1.2.2 Tatuajes. . . . .	3
1.2.3 Aretes . . . . .	3
1.2.4 Collares . . . . .	3
1.2.5 Marcas. . . . .	4
1.3 Primeros Métodos de Laboratorio para la Identificación de Individuos . . . . .	5
1.3.1 Polimorfismo en Grupos Sanguíneos Bovinos . . . . .	6
1.3.2 Antígenos Linfocíticos Bovinos (BoLA) . . . . .	7
1.4 Genotipificación de Individuos por Análisis de ADN Genómico. . . . .	8
1.4.1 Naturaleza y Función del ADN . . . . .	8
1.4.2 Polimorfismo del ADN Genómico . . . . .	9
1.4.2.1 Minisatélites o VNTR's . . . . .	9
1.4.2.2 Microsatélites o STR's . . . . .	10
1.4.3 Marcadores de Tipo STR's Recomendados por la ISAG . . . . .	12
1.4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) . . . . .	14
1.4.4.1 Ciclos de la PCR . . . . .	17
1.5 Descripción de las Razas Bovinas Brahman y Brangus. . . . .	17
1.5.1 Raza Brahman . . . . .	17
1.5.2 Raza Brangus . . . . .	23
1.6 Justificación . . . . .	25
1.7 Objetivos . . . . .	26
1.7.1 Objetivo General . . . . .	26
1.7.2 Objetivos Particulares . . . . .	26
2. MATERIALES Y METODOS . . . . .	27
2.1 Población. . . . .	27
2.2 Aislamiento de ADN Genómico . . . . .	29
2.2.1 Obtención de ADN a Partir de Sangre Completa . . . . .	29
2.2.2 Obtención de ADN a Partir de Semen Congelado . . . . .	31
2.2.3 Verificación de la Concentración de ADN . . . . .	32

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
2.3 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa de 8 Marcadores de Tipo Microsatélites . . . .	33
2.3.1 Condiciones y Parámetros de los Programas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa . . . . .	34
2.4 Electroforesis, Tinción e Identificación de Variantes . . . . .	36
2.4.1 Método de Electroforesis . . . . .	37
2.4.2 Resolución de los Fragmentos Amplificados . . . . .	41
<b>3. RESULTADOS . . . . .</b>	<b>43</b>
3.1 Condiciones Experimentales . . . . .	43
3.2 Concentrado de Resultados. . . . .	44
3.2.1 Genotipos en la Raza Brahman . . . . .	44
3.2.2 Genotipos en la Raza Brangus . . . . .	50
3.3 Inferencia Estadística . . . . .	51
3.3.1 Número de Alelos. . . . .	52
3.3.2 Frecuencia de Alelos . . . . .	53
3.3.3 Heterocigosidad. . . . .	56
3.3.4 Probabilidad de Exclusión . . . . .	58
3.3.5 Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) . . . .	61
3.3.6 Comparación de Resultados . . . . .	62
<b>4. DISCUSIÓN. . . . .</b>	<b>65</b>
4.1 Tipificación por PCR Múltiple de BM 1824, BM 2113 y SPS 115. . . . .	66
4.2 Tipificación por PCR Múltiple de ETH 3, ETH 10 y ETH 225 . . . . .	67
4.3 Tipificación por PCR Múltiple de TGLA 122 y TGLA 227 . . .	68
4.4 Probabilidad de Exclusión Total . . . . .	69
<b>5. CONCLUSIÓN . . . . .</b>	<b>70</b>
<b>REFERENCIAS. . . . .</b>	<b>73</b>
<b>APENDICE. . . . .</b>	<b>77</b>
Preparación de Soluciones y Reactivos. . . . .	78

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Secuencia Repetitiva de 15 Pares de Bases . . . . .	10
2. Secuencia Repetitiva de 3 Pares de Bases . . . . .	11
3. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa . . . . .	16
4. Ejemplar de la Raza Brahman. . . . .	21
5. Ejemplar de la Raza Brangus Negro. . . . .	24
6. Verificación de Aislamiento de ADN y Concentración por Comparación con Fago Lamda. . . . .	33
7. Integración Gráfica de las Etapas del Programa de PCR . . . . .	36
8. Verificación de Amplificación del Múltiple 1 en Gel de Agarosa al 2% . . . . .	38
9. Verificación de Amplificación del Múltiple 2 en Gel de Agarosa al 2% . . . . .	38
10. Verificación de Amplificación del Marcador ETH 3 en Gel de Agarosa al 2%. . . . .	39
11. Verificación de Amplificación del Múltiple 3 en Gel de Agarosa al 2% . . . . .	39
12. Secuenciador ABI Prism 373A Perkin Elmer . . . . .	42
13. Gráfica Comparativa de Alelos por Marcador Genético entre las Razas Brahman y Brangus . . . . .	53
14. Gráfica Comparativa de Heterocigosidad por Marcador Genético entre las Razas Brahman y Brangus. . . . .	57
15. Gráfica Comparativa de Probabilidad de Exclusión por Marcador Genético entre las Razas Brahman y Brangus. . . . .	59

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I Características de los Microsatélites . . . . .	13
II Descripción de la Distribución de las Muestras. . . . .	28
III Ordenamiento de los Marcadores por PCR Múltiple. . . . .	33
IV Concentraciones de Reactivos por Múltiple de PCR . . . . .	35
V Programas de PCR Múltiple. . . . .	36
VI Grupo 1: Tríos que Confirman Paternidad de Ambos Progenitores . . . . .	46
VII Grupo 2: Tríos en los que no Corresponde el Padre . . . . .	47
VIII Grupo 3: Tríos en los que no Corresponde la Madre . . . . .	48
IX Grupo 4: Tríos en los que no Corresponde ningún Progenitor . . . . .	49
X Genotipos de la Raza Brangus. . . . .	50
XI Cuadro Comparativo del Rango en pb del Múltiple 2 . . . . .	52
XII Frecuencias de 8 Microsatélites en la Raza Brahman . . . . .	54
XIII Frecuencias de 8 Microsatélites en la Raza Brangus. . . . .	55
XIV Heterocigosidad de 8 Microsatélites en la Raza Brahman. . . . .	56
XV Heterocigosidad de 8 Microsatélites en la Raza Brangus . . . . .	56
XVI Probabilidad de Exclusión Combinada de los 8 Marcadores en la Raza Brahman . . . . .	60
XVII Probabilidad de Exclusión Combinada de los 8 Marcadores en la Raza Brangus. . . . .	60
XVIII Contenido de Información del Polimorfismo de 8 Microsatélites en la Raza Brahman . . . . .	61

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
XIX Contenido de Información del Polimorfismo de 8 Microsatélites en la Raza Brangus . . . . .	61
XX Cuadro Comparativo del PIC del Múltiple 2. . . . .	62
XXI Cuadro Comparativo de los Parámetros Génicos entre las dos Razas. . . . .	63
XXII Comparación de Resultados del Múltiple 3 en la Raza Brangus con el Reporte de Heyen y col. en la Raza Angus. . . . .	64

## NOMENCLATURA

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
A	Adenina
C	Citosina
dNTP's	Desoxirribonucleosidos Trifosfatados
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetracético
°C	Grados Centígrados
G	Guanina
Ng	Nanogramo
μM	Micromolar
mm <sup>3</sup>	Milimetro Cúbico
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PE	Probabilidad de Exclusión
Pi	Frecuencia del Alelo i
PIC	Contenido de Información del Polimorfismo
Ph	Logaritmo Inverso de la Concentración de Iones Hidrógeno
rpm	Revoluciones por Minuto
SDS	Lauril Sulfato de Sodio
STR	Repeticiones Cortas en Tándem
T	Timina
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i>
U	Unidades

**UV**      **Ultravioleta**

**VNTR**      **Repeticiones en Tándem de Número Variable.**

## RESUMEN

Juan Carlos Gómez De la Fuente

Fecha de Graduación: Noviembre, 2001

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Título del Estudio : DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GÉNICAS DE 8 MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS BRAHMAN Y BRANGUS EN EL NORESTE DE MÉXICO.**

Número de páginas: 81

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias Veterinarias con especialidad en Producción Animal

Area de Estudio : Biotecnología Animal

**Propósito y Método del Estudio :** En Genética animal, actualmente se utiliza la determinación de marcadores polimórficos en el ADN llamados microsatélites como una forma irreproducible y exacta de identificar individuos. La variabilidad de estos marcadores genéticos son únicos para cada individuo por lo que al conocer su genotipo se facilita su identificación para posteriormente establecer el grado de relación familiar con otros individuos de una determinada población.

Para establecer un panel de marcadores útiles en la determinación de parentesco es necesario realizar un análisis que determine los mas polimórficos, por ello en esta tesis planteamos el objetivo de conocer el número de variantes y frecuencias génicas de 8 microsatélites recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal en las razas bovinas Brahman y Brangus pertenecientes a la población del Noreste de México, para dar origen a un banco de información genética que oriente al adecuado uso de los marcadores mas informativos con el fin de identificar individuos y realizar pruebas de paternidad en la progenie de reproductores de alto rendimiento.

A partir del ADN obtenido de sangre y de semen de los individuos sujetos al estudio, se amplificaron 8 marcadores genéticos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, lo cual permitió establecer la respectiva frecuencia génica y polimorfismo de cada uno de ellos dentro de la población sujeta al estudio. El ADN se obtuvo mediante la utilización del método de desalado, haciendo una modificación en nuestro laboratorio para el aislamiento de ADN a partir de semen.

La calidad cuantitativa del ADN obtenido se verificó por comparación con diluciones de fago lambda de concentración conocida mediante corrimiento en gel de agarosa al 0.8%.

Los microsatélites fueron amplificados en grupo mediante programas de PCR múltiple, verificándose los resultados por comparación con un marcador de peso molecular con fragmentos de 100 a 1000 pb, visualizándolo mediante trasiluminación ultra violeta de los fragmentos teñidos con bromuro de etidio en el aparato fotodocumentador Fluor S Multi Imager y la utilización del programa computacional Multianalyst de Bio-Rad.

La resolución de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis vertical en el secuenciador automático ABI PRISM 373A de Perkin Elmer, en el laboratorio de Biopatología Veterinaria de la Universidad de Texas A&M, ubicada en College Station, Tx.

En base a los resultados obtenidos en los parámetros de frecuencia génica, heterocigosidad y polimorfismo, se logró inferir que los marcadores mas informativos dentro del panel analizado para la raza Brahman fueron el BM 2113, el SPS 115, el ETH 10, el ETH 225, el TGLA 122 y el TGLA 227; mientras que en la raza Brangus fueron los marcadores BM 2113, SPS 115, ETH 3, ETH 10, ETH 225 y TGLA 227. La probabilidad de exclusión obtenida, considerando estos marcadores, fue de 0.993 y 0.999 para las razas Brahman y Brangus respectivamente.

Los marcadores que no fueron suficientemente informativos y que se recomienda su remplazo fueron el ETH 3 para la raza Brahman y el TGLA 122 para la raza Brangus, así como el BM 1824 para ambas razas.

**Contribuciones y Conclusiones :** Los resultados obtenidos nos permitieron determinar los marcadores mas informativos dentro del panel analizado, lo cual facilita su utilización con seguridad en análisis genealógicos, dado que los valores de probabilidad de exclusión definen esta herramienta de identificación de individuos como la mejor alternativa en el control genealógico de una población de bovinos, en sustitución del método tradicional de tipificación sanguínea; sin embargo se recomienda continuar la investigación con otros microsatélites que resulten de mayor aplicación para sustituir los menos polimórficos obtenidos en este estudio.

FIRMA DEL ASESOR :



---