

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Genealogía

Los sistemas de mejoramiento animal han utilizado métodos de selección de individuos con características sobresalientes, destinándolos a actuar como reproductores a fin de lograr generar, dentro de una población, una progenie con características productivas deseadas.

La implementación de técnicas de identificación individual de los miembros de cada hato resultó imprescindible para establecer la referencia genealógica que determinara un mejoramiento animal confiable. Las técnicas más comunes de identificación que se utilizan consisten en descripciones de fenotipo que incluyen la presencia de remolinos de pelo, manchas y color del pelaje así como el empleo de tatuajes y marcas.

Con la utilización de la Inseminación Artificial y la Transferencia de embriones se logró mayor precisión en las pruebas de progenie, sin embargo se requería de registros genealógicos confiables, es decir, para el establecimiento de la genealogía en el ganado de registro es de gran importancia considerar un alto nivel de seguridad en la asignación exacta del parentesco; ya que al ocurrir errores en el pedigrí de animales registrados se puede afectar desfavorablemente

la composición genética de la población, debido a que éste tipo de animales son generalmente utilizados en el mejoramiento genético del hato.

1.2 Métodos tradicionales de identificación

Para el establecimiento de los registros de los descendientes de excelentes reproductores prototipos de cada raza se hace necesario la implementación de métodos de identificación individual, de los cuales a continuación se mencionan los más comunes.

1.2.1 Descripción Fenotípica

Es el medio más común de identificación de los animales. En este método se considera el color de cada animal, sus marcas y demás particularidades físicas; por lo cual tiene muchas deficiencias, por ejemplo, al tratar de identificar a los individuos de una población grande de animales de colores similares tales como el Aberdeen Angus. No obstante, es la base de sistemas de identificación bajo circunstancias específicas. Los animales Frison, Ayrshire, Guernsey y de otras razas de dos colores, se pueden identificar por medio de tarjetas de nacimiento con los patrones de sus marcas en el pelaje. Con las reses de dos colores, el sistema es positivo y dura para toda la vida de cada animal; incluso después, se puede utilizar para identificar la piel de algún animal robado.

1.2.2 Tatuajes

Un medio de identificación común es la utilización de una combinación de números y letras tatuadas en las orejas de las reses. Las marcas son permanentes, no se pueden retirar ni eliminarse en forma accidental; pero para facilitar la lectura, los animales deben tener la piel clara al interior de las orejas.

Aunque sean permanentes, los tatuajes de las orejas de las reses no se pueden leer a menos que se sujete al animal en un corredor.

1.2.3 Aretes

Se están utilizando mucho los rótulos numerados de metal o plástico, colocados en las orejas para reemplazar los tatuajes. Su inconveniente es que pueden romperse al enredarse en los arbustos o retirarse intencionalmente, por lo tanto son considerados como una identificación temporal.

1.2.4 Collares

Es uno de los métodos de identificación más frecuentemente utilizados en ganado estabulado. Los collares son de plástico o de cadena metálica con discos de plástico, pueden ser de varios colores y tienen números y letras claramente visibles.

1.2.5 Marcas

El marcaje es el método de identificación preferido en la mayoría de las ganaderías de bovinos productores de carne y se suele hacer con un hierro caliente. Las marcas se pueden modificar a propósito, pero las que están bien delineadas son difíciles de cambiar sin que se note. Las marcas son utilizadas para denotar la propiedad y a cada ganadero se le asigna un registro del mismo. La colocación descuidada de las marcas en el animal puede reducir el valor de la piel, en el ganado para sacrificio la marcación puede hacerse en la mejilla, las ancas o la pata; en el caso de los animales reproductores en los cuales su identificación es esencial, se recomienda poner la marca donde sea más fácil leerla. Esto se hace por lo común en el flanco o sobre el lomo (Barrett y Larkin, 1979).

Aún cuando los métodos tradicionales de identificación tenían un valor de utilidad, resultaban demasiado subjetivos y escasamente informativos, por lo cual no ofrecían seguridad en la identificación de aquellos animales ajenos a un pedigrí de excelencia. Es decir, ninguno brinda seguridad en la identificación fidedigna de los progenitores con relación a una cría, y más aún en las prácticas reproductivas donde no se encuentra físicamente uno o ambos progenitores; por lo cual se hace necesario el uso de marcadores permanentes en cada individuo, a fin de lograr la identificación confiable del individuo con el propósito de establecer su registro genealógico.

Como una forma de dar solución a los problemas de esta naturaleza se empezaron a desarrollar metodologías más objetivas de identificación individual, a partir del análisis de caracteres heredables.

1.3 Primeros métodos de laboratorio para la identificación de individuos

Actualmente el uso de procedimientos artificiales de reproducción ha generado la necesidad de implementar técnicas de identificación de parentesco, por lo que se han desarrollado algunas que permiten clasificar los individuos de una especie de acuerdo a ciertos caracteres permanentes, específicos y heredables como es el caso de la tipificación sanguínea, la cual ha tenido un uso considerable durante los últimos 40 años, y más recientemente el análisis del Ácido Desoxirribonucleico (ADN).

Para el análisis de la genealogía se ha considerado importante obtener ciertos caracteres heredables con gran variabilidad que permitan conocer información única de cada individuo para facilitar su identificación.

Los métodos de laboratorio más utilizados en análisis de parentesco se basan en el estudio de marcadores genéticos como grupos sanguíneos y antígenos de histocompatibilidad los cuales permiten clasificar individuos por sus variantes en estos caracteres.

1.3.1 Polimorfismo en Grupos Sanguíneos Bovinos

Los primeros estudios de identificación en el ganado, utilizando caracteres genéticos, se basaron en la tipificación sanguínea del humano logrando de esta manera la diferenciación y el agrupamiento de individuos en base a un criterio objetivo, gracias al polimorfismo existente en los grupos sanguíneos que a fin de cuentas son la expresión de un genotipo específico (Caldwell, 1986).

El análisis de los grupos sanguíneos en bovinos se inició en 1930; consiste en identificar las variantes mediante la tipificación de los antígenos presentes en los eritrocitos por medio de técnicas serológicas (Caldwell, 1986).

Para análisis genealógicos se han reconocido 11 sistemas independientes, por lo que de los 30 cromosomas de los bovinos, 11 poseen genes que codifican para grupos sanguíneos (Caldwell, 1986).

Dentro de éstos sistemas se conocen más de 100 factores, en los sistemas que involucran muchos factores, estos tienden a segregar en una variedad de combinaciones únicas, llamadas fenogrupos; de cada sistema de grupos sanguíneos un individuo posee 2 fenogrupos, cada uno heredado de su respectivo progenitor (Stormont, 1982).

Con esta variabilidad existente en grupos sanguíneos es posible identificar individuos y establecer su parentesco (Caldwell, 1986; Grosclaude y col., 1981; Larsen, 1982; Oldenbroeck y Bouw, 1974). Sin embargo debido al tiempo requerido en la técnica y al índice de confiabilidad del 98%, ha empezado a ser sustituida por análisis de marcadores genéticos con mayor confiabilidad (Holm y Bendixen, 1996).

1.3.2 Antígenos Linfocíticos Bovinos (BoLA)

Partiendo de la premisa de que entre mayor sea el polimorfismo de un carácter genético se lograría en mayor grado la identificación de un individuo, se analizaron entonces otros caracteres más específicos, resultando así el uso de otros tipos de marcadores genéticos como el MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) denominado BoLA (Antígeno Linfocítico Bovino) en el ganado bovino, el cual permitió la clasificación de individuos por reacciones inmunológicas; lamentablemente esta prueba presentó algunas limitaciones en su uso, debido a que su proporción polimórfica no permite identificar en forma precisa un individuo en pruebas de parentesco; sin embargo sí puede excluir aquellos individuos que no lo son (Caldwell, 1986).

El análisis de los grupos sanguíneos linfocíticos está dado por las variantes existentes en los antígenos de superficie presentes en los linfocitos, los cuales están codificados por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de los bovinos, por lo cual tiene mayor aplicación práctica en la selección de individuos resistentes a algunas enfermedades, dado que el Complejo Mayor de Histocompatibilidad está involucrado en el mecanismo de respuesta inmunitaria (Caldwell, 1986).

1.4 Genotipificación de Individuos por Análisis de ADN Genómico

1.4.1 Naturaleza y Función del ADN

El ADN es una macromolécula de doble hélice cuya estructura fue descubierta por Watson y Crick en 1953 (Karp, 1996). Es un polímero compuesto por dos cadenas de nucleótidos entrelazadas que forman una doble hélice. Las dos hebras se mantienen unidas mediante la formación de enlaces entre bases de cada una de las hebras. Las dos hebras tienen orientación antiparalela debido a su estructura complementaria y su polaridad en la unión fosfodiéster del fosfato y carbono 5' de la desoxirribosa en un extremo y el fosfato y carbono 3' de la desoxirribosa (Griffiths y col. 2000).

Los nucleótidos o bases nitrogenadas interactúan en un orden específico en el que sólo existen dos pares de bases: A-T (Adenina-Timina) y G-C (Guanina-Citosina). Se dice que las bases de éstas parejas son complementarias, es decir, que en cualquier parte de la estructura de ADN las únicas asociaciones base-base que pueden existir entre las cadenas, sin distorsionar la doble hélice son A-T y G-C (Griffiths y col. 2000).

El ADN es el material hereditario que se transmite de una generación a la siguiente, dictando las características propias del individuo dentro de su especie, aunque también se hereda de manera íntegra ADN estructural no codificante que por su polimorfismo ha obtenido importancia de utilidad en la identificación de individuos (Holm y Bendixen, 1996).

Con el desarrollo de investigaciones relacionadas al conocimiento de la información genética se pretendió obtener referencias propias y únicas de un individuo para su identificación dentro de una población.

1.4.2 Polimorfismo del ADN Genómico

En la década de los 70s, con la innovación en técnicas de genética molecular sustentadas en el análisis de la información contenida en el ADN se descubrieron los primeros polimorfismos en las secuencias de ADN, que dió origen a una nueva clase de marcadores genéticos moleculares con los cuales se desarrolló la técnica conocida como fingerprinting (huella digital ADN multilocus) que consistió en explorar y localizar un número grande de loci en el genoma y la identificación de secuencias repetitivas en su estructura, llamadas minisatélites (Amigues y col.,1996; Aznar y col.,1996; Bates y col.,1996;Jeffreys, 1985).

1.4.2.1 Minisatélites o VNTR's .

Son estructuras de ADN tipo II presentes en secuencias repetitivas de 15 pares de bases en promedio (Figura 1), las cuales se encuentran concentradas principalmente en las regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas (Karp, 1996).

Se les denomina también Repeticiones en Tándem de Número Variable (VNTR), debido a su conformación estructural repetitiva.

atgcactgaggtgct atgcactgaggtgct atgcactgaggtgct

Figura 1. Secuencia Repetitiva de 15 Pares de Bases

Aún cuando su descubrimiento fué el primer paso para la aplicación del estudio de ADN en la identificación de individuos, posteriormente se consideró a los minisatélites de menor utilidad para análisis genéticos por su limitado polimorfismo en comparación con otras secuencias mas cortas de mayor variabilidad como los microsatélites (Georges y col., 1991). El valor informativo del polimorfismo de un locus determinado se sustenta en el grado de variabilidad que presente, es decir, la cantidad de alelos diferentes y cada uno con baja frecuencia.

1.4.2.2 Microsatélites ó STR's.

El análisis del ADN se ha perfeccionado mediante la técnica de PCR al considerar secuencias repetitivas más cortas llamadas microsatélites o Repeticiones Cortas en Tándem (STR), las cuales a diferencia de los minisatélites se encuentran en todo el genoma, dando con ello mayor utilidad en análisis genéticos debido a su gran variabilidad que permite disminuir considerablemente la probabilidad de error en la identificación de individuos (Georges y col., 1991).

Considerando el alto grado de exactitud y el corto tiempo en la obtención de resultados, esta nueva técnica se podría catalogar como la panacea en el esclarecimiento de paternidad en animales de alto valor económico y zootécnico,

además de tener una gran cantidad de aplicaciones de tipo productivo y de investigación. (Ellis, 1986; Simpson, 1989; Smith y col., 1986).

Estos fragmentos de ADN son secuencias repetitivas tipo II más cortas que los VNTR's, pues tienen una longitud de 2 a 5 pares de bases (Figura 2). Tienen la particularidad de estar distribuidas en todo el genoma y son consideradas secuencias estructurales (Karp, 1996).



Figura 2. Secuencia Repetitiva de Tres Pares de Bases

Las diferencias en el número de repeticiones constituyen los alelos de los microsatélites, y se han encontrado algunos que tienen hasta 20 alelos diferentes (Wilkie y col., 1992).

Debido a su gran polimorfismo, se ha utilizado su análisis para identificación de individuos con aplicación práctica en determinación de parentesco, así como en la investigación de enfermedades genéticas y en Zootecnia (Gros y col., 1981; Malo y col., 1973; Stach y col., 1984).

Debido a que los microsatélites se clasifican como secuencias tipo II, son estructuras de ADN que a diferencia de los genes:

- a) no codifican proteínas,
- b) no están sujetos a la selección natural
- c) presentan un alto grado de polimorfismo

(Fries y col., 1993; O'Brian y col., 1993).

1.4.3 Marcadores de Tipo STR's Recomendados por la ISAG.

Aún cuando en la actualidad se sigue utilizando la tipificación de los grupos sanguíneos como el estándar internacional para la identificación de la paternidad, en la 25a. Conferencia de la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) efectuada en Tours Francia en 1996, se recomendó el uso de un panel de 9 marcadores de ADN de tipo microsatélites como estándar internacional para su evaluación y uso en el análisis de la genealogía en bovinos (Caldwell, 1996).

La amplificación de estos marcadores resulta de gran importancia en los programas de mejoramiento genético al proporcionar seguridad y exactitud en los registros genealógicos, más aún cuando se generaliza el empleo de la inseminación artificial y la transferencia de embriones en donde los progenitores no se encuentran físicamente presentes en los hatos y pudieran ocurrir errores en la asignación de la paternidad a aquellos individuos que constituirían el pié de cría, teniendo por lo tanto un gran impacto en la composición genética de la población bovina (Caldwell, 1986; Glowatzki-Mullis y col., 1995).

Con la aplicación de esta técnica en la filiación genealógica de los registros raciales se lograría establecer un estricto control en las líneas genéticas de animales de alto rendimiento, a la vez que permitiría identificar con exactitud la propiedad de los mismos.

En la Tabla I se describen las características de 8 de los 9 microsatélites recomendados por la ISAG, el tamaño del segmento amplificado, su localización cromosómica y la secuencia de los iniciadores de PCR de cada uno de ellos (Caldwell, 1996).

Tabla I
Características de los Microsatélites

Nombre del marcador	Tamaño (pares de bases)	Cromosoma	Secuencia de iniciadores
BM 1824	178-190	1	I1: GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC I2: CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG
BM 2113	125-143	2	I1: GCT GCC TTC TAC CAA ATA CCC I2: CTT CCT GAG AGA AGC AAC ACC
SPS 115	240-262	15	I1: AAA GTG ACA CAA CAG CTT CTC AG I2: AAC GAG TGT CCT AGT TTG GCT GTG
ETH 3	117-129	19	I1: GAA CCT GCC TCT CCT GCA TTG G I2: ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G
ETH 10	210-226	5	I1: GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA A I2: CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC
ETH 225	140-156	9	I1: GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T I2: ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT
TGLA 122	130-164	21	I1: CCC TCC TCC AGG TAA ATC AGC I2: AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA C
TGLA 227	78-104	18	I1: CGA ATT CCA AAT CTG TTA ATT TGC T I2: ACA GAC AGA AAC TCA ATG AAA GCA

La selección de éstos microsatélites se dio basándose en las siguientes características y condiciones:

- localización en diferentes cromosomas
- posibilidad de ser detectados mediante reacciones de PCR múltiplex
- alto grado de polimorfismo
- buena amplificación
- disponibilidad pública de los iniciadores y protocolo de PCR.

1.4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es una nueva técnica desarrollada por Kary Mullis en 1983, que en la actualidad se utiliza para amplificar un fragmento de ADN específico (Mullis, 1987).

Consiste en utilizar la enzima polimerasa proveniente de la bacteria *Thermophilus aquaticus*, la cual permanece estable a temperaturas de 90°C, muy por encima de la temperatura que destruye la actividad de otras polimerasas de ADN (Mullis, 1987).

Con esta enzima se desarrolló la técnica de PCR, en la cual una sola región de ADN (microsatélite en este caso), se puede amplificar con rapidez y a bajo costo (Karp, 1996). Esta técnica tiene la ventaja de permitir la utilización de diversos tipos de muestras biológicas, como sangre, gametos, pelo, etc. (Hohenhorst y col., 1994; Mullis y Faloona., 1987; Watson y col., 1992).

El procedimiento de la técnica de PCR en términos generales, se basa en tres pasos (Figura 3):

1.- Desnaturalización de ADN a 94 °C.

La muestra de ADN se mezcla con los 4 desoxirribonucleótidos y la polimerasa de *Thermophilus aquaticus*, junto con los dos fragmentos de ADN sintéticos cortos (oligonucleótidos) complementarios de las secuencias de ADN en los extremos 3' de la región de ADN que se desea amplificar.

Los oligonucleótidos sirven como sondas que identifican su contraparte en el ADN template para iniciar la duplicación del mismo por la inserción de los desoxirribonucleótidos durante la acción de la Polimerasa.

Esta mezcla se calienta a 92-94°C, para separar las moléculas de ADN de la muestra en sus cadenas componentes.

2.-Hibridación de iniciadores .

A continuación se enfría la mezcla para permitir que los iniciadores se enlacen a los extremos 3' de ambas cadenas del ADN específico y la polimerasa añada nucleótidos a los extremos 3' de los iniciadores.

La temperatura de emparejamiento de los iniciadores a la cadena template de ADN es menor a la de desnaturalización y esta dada por el valor mínimo de temperatura requerido para el anclaje de los mismos.

3.- Síntesis de ADN.

Se eleva nuevamente la temperatura a 72°C con la finalidad de activar la enzima para desarrollar la amplificación; a medida que la polimerasa alarga los iniciadores, copiando selectivamente el ADN específico, forma nuevas cadenas de ADN complementarias.

Elevando una vez más la temperatura, las cadenas de ADN originales y las recién formadas se separan. Enseguida se enfría la muestra para permitir que los iniciadores sintéticos en la mezcla se unan otra vez a los extremos 3' del ADN específico, que ahora está presente en cantidad doble de la original y reiniciando un segundo proceso idéntico al anterior, a esto se le denomina ciclo. Cada ciclo sucesivo duplica esencialmente la cantidad de ADN sintetizado en el ciclo

anterior, por lo tanto resulta una acumulación exponencial del fragmento blanco específico de 2^n donde "n" representa el número de ciclos.

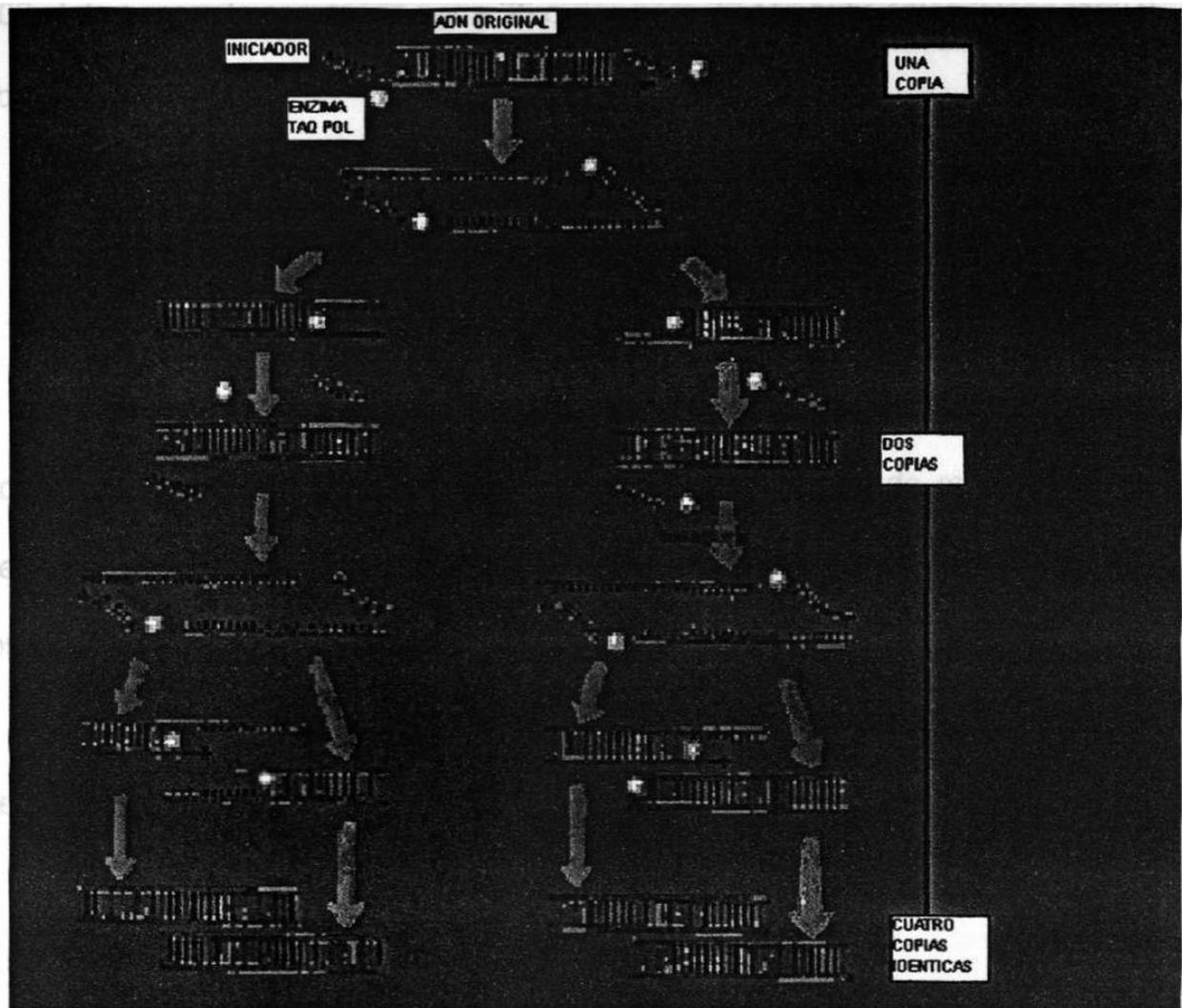


Figura 3. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

1.4.4.1 Ciclos de la PCR.

El óptimo número de ciclos depende en la concentración principal de ADN blanco. Se usan 25-30 ciclos para 10,000 moléculas blanco ya que los bovinos tienen por lo menos 10,000 células blancas por mm^3 de sangre, entonces para 100 μl de sangre lo apropiado sería 35 ciclos pero 30 son suficientes (Henegariu y col., 1997).

1.5 Descripción de las Razas Bovinas Brahman y Brangus

En éste estudio se contempló el análisis de 8 microsatélites polimórficos en dos razas bovinas, con el fin de implementar una técnica de reconocimiento genético que permita proporcionar confiabilidad a las cédulas de identificación de los individuos de ésta especie.

A continuación se describe el origen, características fenotípicas y productivas de las razas Brahman y Brangus.

1.5.1 Raza Brahman

El origen de esta raza se remonta al Pleistoceno, cuando los glaciares compelieron a los bóvidos a refugiarse en la actual región del Himalaya. Durante el Mioceno, la familia *Bos* se diferenció en dos tipos: *Auroch* o *Bos primigenius* y *Bos indicus* (Enríquez, 1995).

El *Bos primigenius* emigró al Continente Europeo, cuando la capa de hielo se retiró, originando el *Bos taurus* y distribuyéndose fuera de la isoterma tropical al norte de la latitud 30° (Enríquez, 1995).

El *Bos indicus* o cebú por su parte, se distribuyó en la isoterma tropical, entre las latitudes 30° norte y 30° sur, en parte de Asia, Africa y Europa.

La domesticación del cebú data de 2,500 años A.C., y llevó una vida nómada durante siglos. Por considerarlo animal sagrado, se prohibió el sacrificio de vacas en la India, su lugar de origen; las leyes religiosas Brahmánica y Budista prohibían comer la carne de vaca (Vizcarra, 1975).

Su origen primario es considerado de la India y en forma secundaria del sur de los Estados Unidos de América. En la India la palabra Brahman corresponde al Dios supremo de los Hindúes. En Europa, México, Centro América y América del Sur, el ganado proveniente de la India (*Bos indicus*) recibe el nombre de Zabú ó Cebú. En los Estados Unidos de América recibe el nombre de Brahman (Enríquez, 1995).

Las primeras importaciones de ganado cebú a los Estados Unidos fueron realizadas en 1849 por el Dr. James Bolton Davis, de Fairfield Country, Carolina del Sur; cuando éste era asesor de Agricultura del Sultán de Turquía.

Posteriormente ocurrió el ingreso de dos toros *indicus* a Francisville, Laramie por obsequio de la Corona Británica al agricultor Richard Barrow en 1885.

De 1905 a 1906, el Rancho de Pierce, Texas, ayudado por Thomas M. O'Connor, de Victoria, Texas, importaron treinta y seis toros y vacas de distinta

estirpe de ganado Indio, ocurriendo en 1924 la fundación de la asociación de criadores de la raza Brahman con oficinas en Houston, Texas (Enríquez, 1995).

La raza Brahman o Cebú americano, se considera entre los zootecnistas especializados como un mestizo de Guzerat y Nelore e híbrido también, probablemente de Hereford y Shorthorn; que en su iniciación fueron utilizados para acortar los miembros, ampliar la caja y engrosar los músculos, es decir, se logró una excelente conformación para producción de carne en pastos ricos y abundantes (Vizcarra, 1975).

Los autores Hilton B. Briggs, de la Universidad de Dakota del Sur; Dinus M. Briggs, de la Universidad del estado de Iowa; y Stewarth H. Fowler de la Universidad del estado de Louisiana coinciden en que la composición genética de la Raza Brahman americana esta dada por la sangre de ganado Cebú, Guzerat, Gyr, Nelore, Indobrasil, Shorthorn y Hereford; siendo de estas dos razas europeas que el Brahman americano adquirió la gran amplitud del dorso, lomo y grupa, asi como la horizontalidad de la línea superior y la giba cervicodorsal más bien que dorsal (Enríquez, 1995).

Esta raza de ganado bovino es muy aceptada en México por su adaptación al clima Tropical, siendo sus principales características las siguientes:

- a) Aprovechamiento de forraje
- b) Rusticidad
- c) Tolerancia al calor
- d) Resistencia a ciertos parásitos y enfermedades.
- e) Descripción Fenotípica

a) Aprovechamiento de forraje

Esta raza llega a subir de peso de 800 a 900 gramos diarios en pastoreo y proporciona un mayor rendimiento de carne limpia dada la menor capacidad volumétrica de su aparato digestivo. En una explotación intensiva o de alta nutrición estas cifras se superan en ganancia de peso diario. Sus híbridos suelen rebasar los 1,500 gramos de peso diario.

b) Rusticidad

El ganado Brahman es superior a otras razas en su rendimiento en climas tropicales, pues consume mayor número de especies vegetales y realiza un superior aprovechamiento de nutrientes secos.

c) Tolerancia al Calor

Gracias al notable sistema de regulación de altas temperaturas que posee esta raza, puede pastar bajo los rayos solares directos un 40% más de tiempo que las razas europeas, sin necesidad de buscar la sombra, mientras que éstas tienen que descansar bajo la misma constantemente, jadeando y obstaculizando su normal alimentación. Varias teorías tratan de explicar esta resistencia: que en el cebú las glándulas sudoríparas son mayores y más numerosas que en las otras razas; que la papada enorme y plegada, así como su piel abundante a través de la línea media inferior, actúa como radiador proporcionando una superficie adicional para la evaporación; que el pelo abundante y corto puede ofrecer un aislamiento adicional contra el calor, basándose en que tiene de 1775 a 2000 pelos por centímetro cuadrado, mientras que las otras razas poseen tan sólo 1095 en igual superficie. Mayor cantidad de glóbulos rojos por centímetros cúbicos. El color de la piel del cebú, lo protege contra la acción agotante de los rayos

ultravioletas, destructores del protoplasma celular, de los cuales es rica la luz solar tropical, por lo que se juzga como defecto el albinismo.

d) Resistencia a ciertos parásitos y enfermedades

El ganado Brahman ofrece mayor resistencia a diferentes tipos de garrapata, tábanos, moscas, ácaros y piojos, lo cual se atribuye a una mayor secreción sudorosa, que pueda obrar como tóxico o repelente; a la piel compacta, con partes subepidérmicas más gruesas que impiden la extracción de sangre, al no alcanzar zonas irrigadas; al pelo corto que dificulta el parasitismo; al mayor desarrollo del panículo carnosos, que proporciona más movimiento de la piel y la posibilidad de permanecer más horas del día pastando expuesto a los rayos solares y obstaculizando así el desarrollo de los ectoparásitos (Vizcarra, 1975).

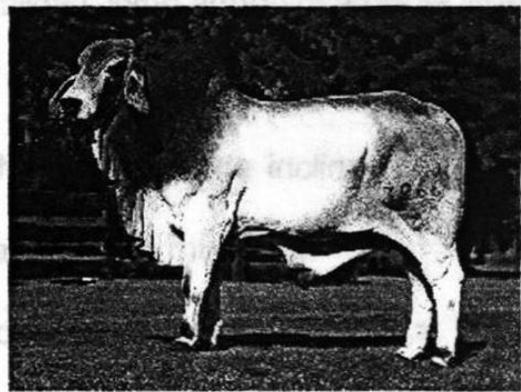


Figura 4. Ejemplar de la Raza Brahman

e) Descripción Fenotípica (Figura 4)

Color.- Gris en sus diversas tonalidades, tercio anterior y posterior generalmente más oscuro en los machos, en las hembras el pelaje es más claro.

Frente.- Ancha, ligera convexidad a plana.

Hocico.- Negro, con ollares bien separados y dilatados en forma de coma.

Orejas.- Tamaño medio, anchura moderada, ligeramente inclinadas y pequeña curvatura en el tercio inferior, con terminación en punta.

Cuernos.- Simétricos y de color oscuro.

Pescuezo.- Proporcional al cuerpo, línea superior ligeramente oblicua, bien musculado en los machos, amplio en su base, unido armoniosamente al cuerpo y a la cabeza sin depresiones. Más largo y fino en las hembras.

Papada.- Comienza bifida en el maxilar inferior, baja hasta el pecho y se prolonga hasta el ombligo, tamaño medio, fina y flexible.

Giba.- Bien colocada sobre la cruz, desarrollada, en forma de riñón, apoyándose en el dorso en machos.

Dorso y Lomo.- Largo, ancho, recto y profundo, ligeramente inclinado tendiendo a la horizontalidad, lomo armoniosamente ligado a la grupa, con buena cobertura muscular.

Grupa.- Larga, ancha y ligeramente inclinada, unida al lomo sin salientes, ni depresiones con buena cobertura muscular.

Cola y mechón.- Cola con inserción armoniosa, larga rematada en una mota negra.

Tórax y costillas.- Tórax amplio, largo y profundo. Costillas largas, bien arqueadas con espacios intercostales bien revestidos de músculos y sin depresión atrás de las espaldas.

Ombligo.- Reducido.

Miembros Anteriores.- De longitud media, bien musculosos, colocados en rectángulo, separados y bien aplomados.

Miembros Posteriores.- De longitud media, pierna y muslos anchos, con buena cobertura muscular, bajando hasta el corvejón. Piernas bien aplomadas y separadas.

Pezuñas.- Negras, bien conformadas, fuertes y lisas; con poca separación interdigital.

Pelo.- Corto, fino y brillante.

Piel.- Suelta, fina, suave, bien pigmentada.

(Enríquez, 1995).

1.5.2 Raza Brangus

Esta raza se obtuvo de un programa de cruzamiento de ganado Brahman y Angus, efectuándose los primeros cruzamientos en la estación experimental del Departamento de Agricultura en Jeanerette, Louisiana, E.U.A. en 1912. Durante el mismo periodo, el rancho Clear Creek de Welch Oklahoma, el rancho Essar de San Antonio, Texas y otros cuantos criadores individuales de los Estados Unidos de América y de Canadá, estaban llevando a cabo programas de cría experimental con la cruce de estas dos razas; los primeros criadores de 16 estados americanos y de Canadá, se reunieron en Vinita Oklahoma el 29 de Julio de 1949 y organizaron la American Brangus Breeders Association, posteriormente nombrada la International Brangus Breeders Association, con sus oficinas centrales en Kansas City, Missouri. En 1972 se instalaron las oficinas centrales en San Antonio, Texas; en la actualidad existen miembros de casi todos los estados de E.U.A., en Canadá, México, Países Centroamericanos, Argentina, Australia.

Su composición genética es de 3/8 Brahman y 5/8 Angus.



Figura 5. Ejemplar de la Raza Brangus Negro

Sus características son las siguientes (Figura 5):

Esta nueva raza es más larga y más alta que la Angus, su característica principal es la tolerancia al calor, debido a sus antepasados Brahman, así como la habilidad materna. El peso promedio al nacimiento es de 32-34 Kg., y los pesos promedio a la edad adulto oscilan en las hembras de 630 a 720 Kg. y en los machos de 810 a 990 Kg. Es de pubertad temprana y su muscularidad deriva del Angus. Su carne es de excelente calidad.

Color.- Negro

Pelo.- Liso y suave

Cabeza.- Sin cuernos

Cuello.- Prominencia en el borde superior entre el morrillo y giba, no muy desarrollada.

1.6 Justificación

En el establecimiento de un registro genealógico confiable que permita identificar descendientes de antecesores sobresalientes, se requiere de un análisis de caracteres heredables únicos e irreproducibles que por su variabilidad representen una alternativa eficaz y exacta en la identificación individual.

En Genética animal, actualmente se utiliza la determinación de marcadores polimórficos en el ADN como una forma confiable 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 esta técnica, es importante caracterizar marcadores genéticos polimórficos como los STR's con mayor frecuencia en la población, de manera que se pueda establecer un panel de los mismos que sirva de referencia en su utilización para pruebas de paternidad.

Mediante el presente trabajo de investigación se pretende establecer el número de variantes y frecuencias génicas de 8 microsatélites 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 el adecuado uso de los marcadores más frecuentes con el fin de identificar individuos y posteriormente realizar pruebas de paternidad en la progenie de reproductores de alto rendimiento, con una confiabilidad del 99%.

1.7 Objetivos

1.7.1 En la presente investigación se plantea el siguiente objetivo general:

Establecer la metodología para el análisis de la genealogía en el ganado bovino de las razas Brahman y Brangus mediante la selección de marcadores de ADN tipo microsatélites.

1.7.2 Este objetivo general contempla los siguientes objetivos particulares:

1.- Determinar el número de alelos y la frecuencia génica de 8 microsatélites, recomendados internacionalmente, en la población de las razas Brahman y Brangus de la región noreste de México.

2.- Calcular el contenido de información de polimorfismo y heterocigosidad de cada uno de los 8 microsatélites.

3.- Establecer el cálculo de la probabilidad de exclusión de cada marcador y en forma combinada, para determinar su utilidad en análisis de paternidad que utilice los microsatélites que resulten de mayor significancia.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se efectuó el análisis del número y frecuencia génica de las variantes alélicas de 8 microsatélites seleccionados por la Sociedad Internacional de Genética Animal, en las razas Brahman y Brangus de la región Noreste de México.

Estos microsatélites seleccionados ya se encuentran caracterizados a nivel de secuencia de nucleótidos. Para su análisis se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con los protocolos establecidos para tal efecto.

Con esta información obtenida se determinó el valor de este tipo de marcadores para el análisis de la genealogía en la población bovina regional de estas dos razas, mediante el cálculo del contenido de información de polimorfismo (PIC), heterocigosidad (H) y probabilidad de exclusión (PE) de los microsatélites individuales y de los mejores en conjunto.

2.1 Población

Para el estudio se aisló ADN a partir de muestras de sangre y semen de 96 bovinos de las razas Brahman y Brangus del noreste de México; dentro de la raza Brahman se comprendió un muestreo de 47 bovinos ordenados en grupos de 16 tríos (supuesto padre, madre e hijo) y 3 pares (supuesto padre e hijo) mientras

que en la raza Brangus se obtuvieron 50 muestras, obedeciendo el muestreo a una elección al azar sin comprender parentesco. (Tabla II)

Tabla II

Descripción de la distribución de las muestras

RAZA	BRAHMAN	BRANGUS
PROGENITOR MACHO	12	0
PROGENITOR HEMBRA	16	0
CRÍA	19	0
ANIMALES AL AZAR	0	50
TOTAL	47	50

El muestreo de los progenitores machos correspondió a la donación de pajillas de semen de 0.5 ml las cuales se transportaron y conservaron en nitrógeno líquido, correspondiendo en su mayoría a sementales que no se encontraban presentes físicamente en el hato y que son utilizados por medio de inseminación artificial, ya que este tipo de reproductores son los que más contribuyen a la composición genética de las poblaciones.

En el caso de aquellos sementales utilizados por monta directa se les tomó muestras de sangre al igual que las progenitoras y la descendencia, manejándose éstas en tubos con anticoagulante (EDTA).

El trabajo de laboratorio se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicada en la Unidad Universitaria Mederos en Monterrey, Nuevo León.

2.2 Aislamiento de ADN Genómico.

El Ácido Desoxirribonucleico representa la parte medular de esta investigación por lo que su aislamiento requiere de técnicas adecuadas para obtenerlo en buena cantidad con una calidad aceptable de manera que facilite su utilización para lograr amplificaciones de PCR óptimas. Una vez probadas diferentes técnicas de aislamiento se definió como opción la técnica de Desalado (salting-out) para sangre completa y en el caso de muestras de semen se aplicó la misma con algunas modificaciones propias de nuestro laboratorio.

2.2.1 Obtención de ADN a Partir de Sangre Completa.

Para la obtención del ADN genómico a partir de muestras de sangre se utilizó el método de desalado descrito por Miller y col. (Miller y col., 1988).

A continuación se describe el material y equipo requerido así como el procedimiento para el aislamiento de ADN.

Equipo requerido:

- Baño maría (70-95° C)
- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Micropipetas de 10, 200 y 1000 μ l
- Microcentrifuga
- Vórtex
- Refrigerador

Procedimiento:

El procedimiento para el aislamiento y conservación de ADN genómico a partir de sangre consiste en cinco fases:

1ª. Lavado de eritrocitos

En un tubo eppendorf conteniendo 750 μl de buffer lisis de eritrocitos se agregan 750 μl de sangre completa homogenizada, se mezcla vigorosamente y se refrigera por 10 minutos, al término de esto se centrifuga por 10 minutos a 14,000 rpm, decantando el sobrenadante y repitiendo por dos ocasiones el mismo procedimiento, utilizando 500 μl del mismo buffer lisis, culminando esta fase al obtener una pequeña pastilla blanca en el fondo del tubo eppendorf.

2ª. Incubación de leucocitos

La pastilla blanca es resuspendida en 150 μl de buffer lisis de leucocitos, agregándose 7 μl de Proteinasa K (10 mg/ml) y 10 μl de SDS al 10%, incubándose a 56°C por 3 horas, dando ligera agitación ocasionalmente.

3ª. Precipitado de ADN

Al término de la incubación se agrega 50 μl de cloruro de sodio al 6M, agitando vigorosamente para después centrifugar por 10 minutos a 14,000 rpm, procediendo a aspirar el sobrenadante pasándolo a un segundo tubo y desechando el precipitado; se repite el centrifugado y se pasa el sobrenadante a otro tubo eppendorf. Al sobrenadante obtenido se le agrega dos volúmenes de Etanol al 100% y se invierte lentamente el tubo para permitir el precipitado del ADN. Una vez que se precipita el ADN se centrifuga a 14,000 rpm por 2 minutos desechando el Etanol, repitiendo un segundo lavado con Etanol al 70%.

4ª. Resuspensión en TE (Buffer Tris-EDTA)

La pastilla de ADN que se encuentra adherida a la pared del tubo se deshidrata al aire libre y se resuspende con 50 a 100 μ l de buffer TE al 1x. Se incuba por 15 minutos a 56°C para lograr una completa integración de ADN en el Buffer TE.

5ª. Almacenamiento.

El ADN genómico se mantiene a una temperatura de -20°C.

2.2.2 Obtención de ADN a partir de Semen Congelado

Para el procesamiento de las muestras de semen se utilizó el procedimiento descrito por Heyen y col, 1997.

Esta técnica se basa en la de desalado, la cual fue modificada en nuestro laboratorio al utilizar un Buffer de lavado en lugar de PBS.

Procedimiento:

- 1.- La pajilla de semen es diluida en 1 ml de buffer de lavado
- 2.- Se homogeniza y se centrifuga a 14,000 rpm por 2 minutos para obtener la pastilla.
- 3.- Se retira el sobrenadante y se resuspende con 1 ml de buffer de lavado, volviendo a homogenizar y centrifugando a 14,000 rpm por 2 minutos.
- 4.- Se desecha el sobrenadante y la pastilla es resuspendida en 450 μ l de buffer de extracción (precalentado a 60°C), agregando 50 μ l de ditioneitol a 0.5M y 10 μ l de Proteinasa K (20 mg/ml).

5.- La solución se incuba a 60-65°C por 6 horas

6.- Posterior a la incubación se agregan 160 µl de solución de Cloruro de Sodio saturada y se agita vigorosamente por 2 minutos.

7.- Se centrifuga por 10 minutos a 14,000 rpm

8.- El sobrenadante se cambia a otro vial y se le agrega 1 ml de Etanol (100%), se mezcla suavemente para precipitar el ADN.

9.- Se centrifuga a 14,000 rpm por 5 minutos, se desecha el Etanol y se resuspende en 1 ml de etanol al 70% (invertir el tubo para lavar la pastilla).

10.- Se vuelve a centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos, se desecha el Etanol.

11.- Se deja secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspende en TE (50-100 µl)

12.- Se incuba en baño maría a 56°C por 15 minutos para integrar el ADN al buffer.

13.- Se almacena a una temperatura de -20°C.

2.2.3 Verificación de la Concentración de ADN

Una vez resuspendido el ADN en 50 µl de buffer TE al 1X se procede a verificar su concentración mediante corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8% a 70 volts por 30 minutos comparando con diferentes concentraciones estándares conocidas de bacteriófago Lambda, siendo la concentración ideal de 50-100 ng. En la Figura 6 se puede observar que la muestra de ADN tiene una

concentración similar a la de los carriles 4 y 5, por lo que su concentración aproximada es de 100 ng/ μ l.

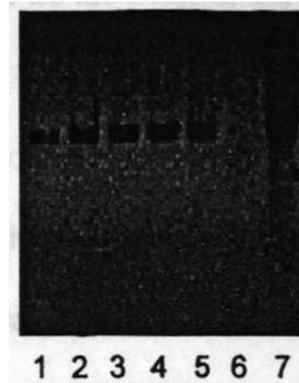


Figura 6. Verificación de Aislamiento de ADN y Concentración por Comparación con Fago Lamda.

1 = 20 ng, 2 y 3 = 50 ng, 4 y 5 = 100 ng, 6 = control neg., 7 = Muestra

2.3 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa de 8 Marcadores de tipo Microsatélites

En este estudio se analizaron 8 loci de microsatélites en tres reacciones de PCR múltiple con diferenciación por tamaño molecular de pares de bases, los cuales se clasificaron como se muestra en la Tabla III, de acuerdo a lo propuesto por la ISAG (Caldwell, 1996).

Tabla III
Ordenamiento de los Marcadores por PCR Múltiple

Múltiple 1	Múltiple 2	Múltiple 3
BM 1824	ETH 3	TGLA 122
BM 2113	ETH 10	
SPS 115	ETH 225	TGLA 227

Los iniciadores de PCR y la localización cromosómica de cada microsatélite se describe en la Tabla I.

2.3.1 Condiciones y Parámetros de los Programas de PCR

Los experimentos efectuados en la estandarización de la técnica de PCR permitieron conocer las condiciones adecuadas para una óptima amplificación, siendo un factor determinante la cantidad de ADN utilizado, la concentración de los oligos iniciadores y la concentración del ion magnesio; los cuales determinaban la formación de productos de amplificación inespecíficos o bien la deficiente amplificación, respectivamente, dependiendo de la cantidad utilizada de los componentes mencionados.

Para establecer las condiciones de amplificación se realizaron diferentes ensayos manteniendo constantes las concentraciones de buffer, dNTP's y la Polimerasa *Taq*.

En primer término se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de $MgCl_2$, de un mínimo de 1.0 mM hasta un máximo de 2.5 mM, utilizando 100 ng/ μ l de ADN y condiciones estándares de amplificación.

La concentración de ADN que se utilizó fue la recomendada por Henegariu y col. (Henegariu y col., 1997) y se evaluó por comparación con la dilución del ADN del fago Lambda.

La condicionante que motivó a la estandarización en la concentración de los oligonucleótidos mas adecuada para cada reacción fue la disponibilidad de las

concentraciones originales; fijándose la cantidad mínima requerida que proporcionara una amplificación definida.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador automático MJ Research con tapa térmica, estandarizando las concentraciones de los elementos de cada reacción como se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV

Concentraciones de Reactivos por Múltiple de PCR

MIX	Oligos	d'NTP's	Buffer	Mg ²⁺	Taq	Agua	ADN
BM's y SPS 115	0.25 μ M	200 μ M	1x	1.5mM	2 U	Aforar a 25 μ l	50-100 ng
ETH 10-225	0.3 μ M	200 μ M	1x	1.5mM	2 U	Aforar a 25 μ l	50-100 ng
ETH 3	0.6 μ M	200 μ M	1x	1.5mM	2 U	Aforar a 25 μ l	50-100 ng
TGLA's	0.4 μ M	200 μ M	1x	1.5mM	2 U	Aforar a 25 μ l	50-100 ng

La mezcla final de cada PCR conteniendo el ADN blanco, los iniciadores, el amortiguador con una concentración de 1.5 μ M de MgCl₂, mezcla de Desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), la *Taq* polimerasa y el agua nanopura fué sometida a diversos programas en el termociclador (Tabla V) los cuales están diferenciados por la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos como condicionante principal (Figura 7).

Tabla V
Programas de PCR Múltiple

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
1.Activación de <i>Taq pol</i>	94°C	4 min
2.Desnaturalización	94°C	1 min
3. Hibridación	Múltiple 1 56°C	1 min
	Múltiple 2 60°C y 66°C*	1 min
	Múltiple 3 56°C	1 min
4.Extensión	72°	3 min
5.Extensión Final	72°C	7 min

* En el múltiple 2 se realizo un duplex de ETH 10 y 225 a 60°C y un PCR sencillo de ETH 3 a 66°C.

La mezcla de reacción se amplifica por 30 ciclos a partir de la etapa 2 hasta la etapa 4.

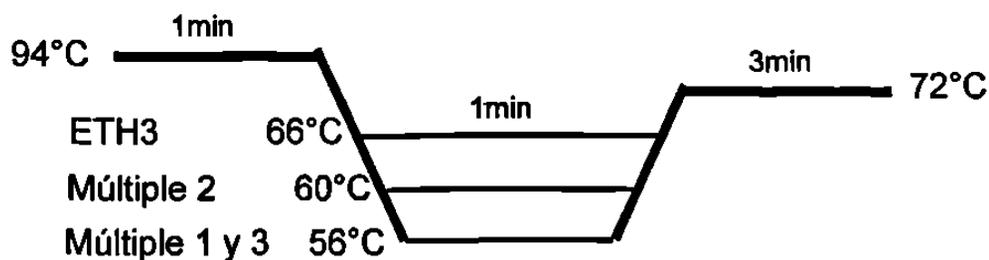


Figura 7. Integración Gráfica de las Etapas del Programa de PCR

2.4 Electroforesis, Tinción e Identificación de Variantes

Una vez obtenidos los productos de PCR se procedió a su verificación, para ello se efectuó una comparación del producto amplificado con una fracción de ADN digerido que arroja una serie de bandas de tamaño específico definido, el cual se denomina marcador de peso molecular; la visualización se logra a través

de la inserción del Bromuro de Etidio en la molécula de ADN lo que permite su refracción fluorescente por acción de radiación Ultravioleta en un transiluminador.

2.4.1 Método de Electroforesis

Considerando la carga eléctrica negativa que posee la molécula de ADN dada por las reacciones intrínsecas de su composición orgánica, se ha logrado desarrollar una técnica de separación de las unidades o fragmentos estructurales de ADN por corrimiento en cámara de electroforesis utilizando un gel que actúa como medio y un amortiguador líquido que lo facilita.

El gel de agarosa utilizado es de un tamaño de 15x10x0.5 cm, la velocidad de migración del jugo azul fue de 4.5 cm por hora a 75 volts.

Al concluir el corrimiento electroforético a 75 volts por 1h en gel de agarosa al 2% en solución buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) al 1x, los productos de ADN amplificados por la PCR se procedió a teñir el Gel por inmersión en una solución con Bromuro de Etidio al 0.1% en agua bidestilada (20 μ l de 10 mg/ml de Bromuro de Etidio en 200 ml de agua bidestilada). Los productos de PCR amplificados fueron visualizados en el transiluminador por efectos de refracción UV de la fluorescencia del BE ligado al fragmento de ADN amplificado, procediendo a comparar su dimensión con un marcador de peso molecular que fue cargado en el mismo gel para así lograr identificar su talla aproximada y clasificarlo (figuras 8, 9, 10, 11).

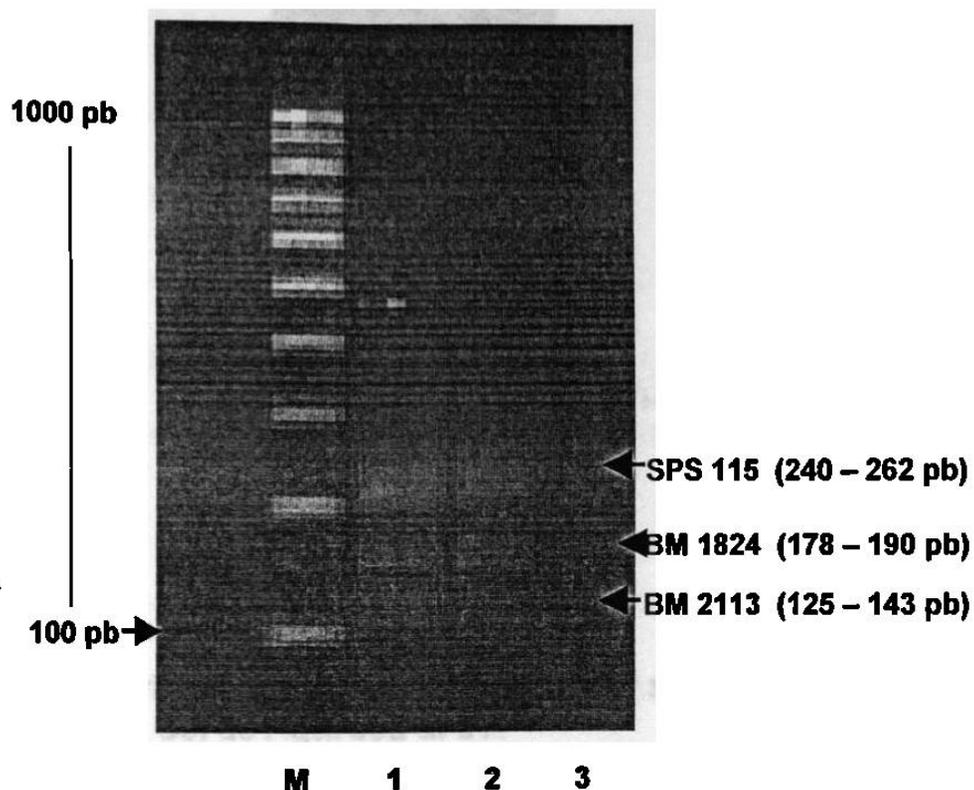


Figura 8. Verificación de Amplificación del múltiple 1 en Gel de Agarosa al 2%

M= Marcador de Peso Molecular de 100 a 1000 pb

1= Muestra 1

2= Muestra 2

3= Control Negativo

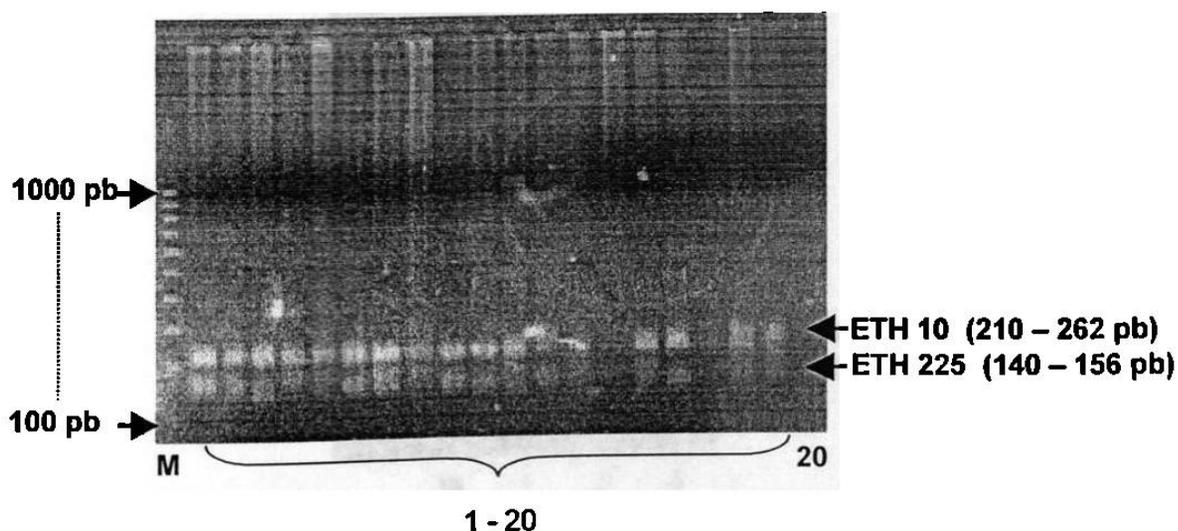


Figura 9. Verificación de Amplificación del múltiple 2 en Gel de Agarosa al 2%

M= Marcador de Peso Molecular de 100 a 1000 pb

1 – 19 = Muestras analizadas, 20= Control Negativo

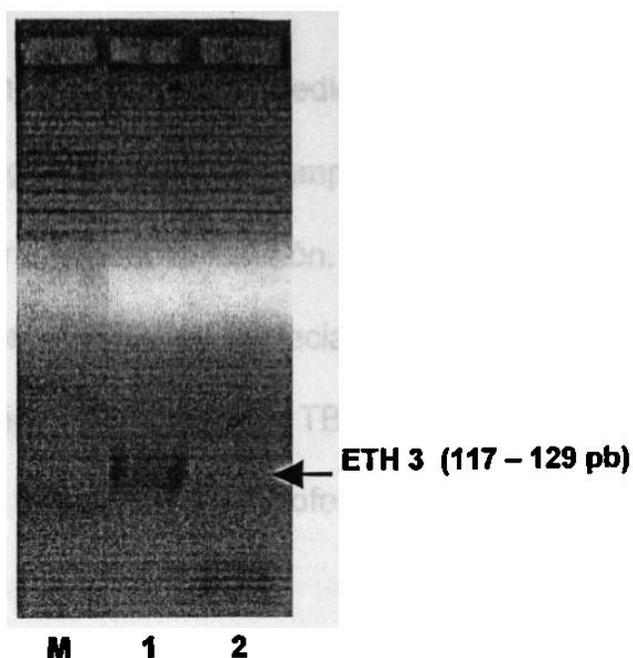


Figura 10. Verificación de Amplificación del marcador ETH 3 en Gel de Agarosa al 2%

M= Marcador de Peso Molecular de 100 a 1000 pb
1 = Muestra, 2 = Control Negativo

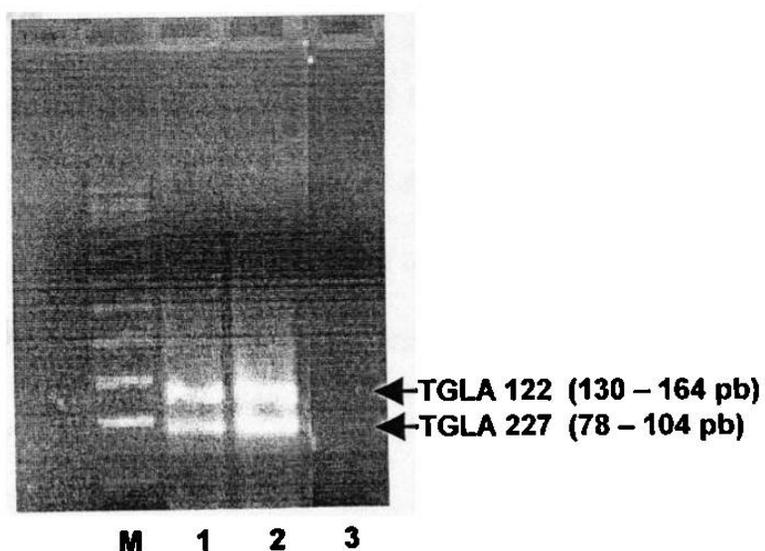


Figura 11. Verificación de Amplificación del múltiple 3 en Gel de Agarosa al 2%

M= Marcador de Peso Molecular de 100 a 1000 pb
1 - 2 = Muestras analizadas, 3 = Control Negativo

Una vez comprobada la amplificación se procedió a correr el mismo producto en gel de poliacrilamida para lograr observar su comportamiento en su variabilidad en el tamaño exacto y estructurar la genotipificación.

Para esto fué necesario preparar un gel especial de poliacrilamida al 5%, el cual es sumergido en la solución amortiguadora TBE con una concentración de 1x, que es contenida en una cámara de electroforesis para secuenciación de ADN.

Las fórmulas y procedimientos de preparación del gel de poliacrilamida se detallan a continuación:

1.- Solución Stock (Poliacrilamida al 30%)

Acilamida base 28.5 g

Bis-acrilamida 1.5 g

Aforar a 100 ml con agua bidestilada

2.- Preparación del gel al 5%

Urea 21 g

TBE 10x 5 ml

Poliacrilamida (30%) 8.33 ml

Aforar a 50 ml con agua bidestilada

Agua 10.8 ml

Tris-HCl pH 6.8 1.9 ml

SDS al 10% 0.15 ml

Persulfato 1% 0.5 ml

TEMED 20 μ l

Esta mezcla se vacía inmediatamente en el molde de la cámara de electroforesis y se coloca el peine con el lado de las puntas hacia adentro procurando no penetrar más de un mm de la superficie de inicio del gel y al formarse los carriles de migración, se procede a enjuagar cada uno con la misma solución buffer y se le da un tiempo de corrimiento sin producto por 40 minutos para lograr dar la temperatura de 50°C adecuada para el proceso, al término de esto se carga el gel con los productos amplificados los cuales están constituidos de la siguiente mezcla : 3 μ l de producto de PCR, 1 μ l de formamida desionizada, y 1 μ l de colorante. Al constituirse ésta mezcla se incuba a 94°C por 4 minutos para desnaturalizar las cadenas de ADN amplificadas y se carga en cada carril la cantidad total de la mezcla.

2.4.2 Resolución de los Fragmentos Amplificados.

La resolución de los productos de PCR se realizaron y documentaron en el secuenciador ABI Prism 373A de Perkin Elmer de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Texas A&M (Figura 12) y su tamaño se determinó con relación a un marcador de peso molecular de carril interno (Bates, y col., 1996; Heyen, y col., 1997; Ziegle, y col., 1992).

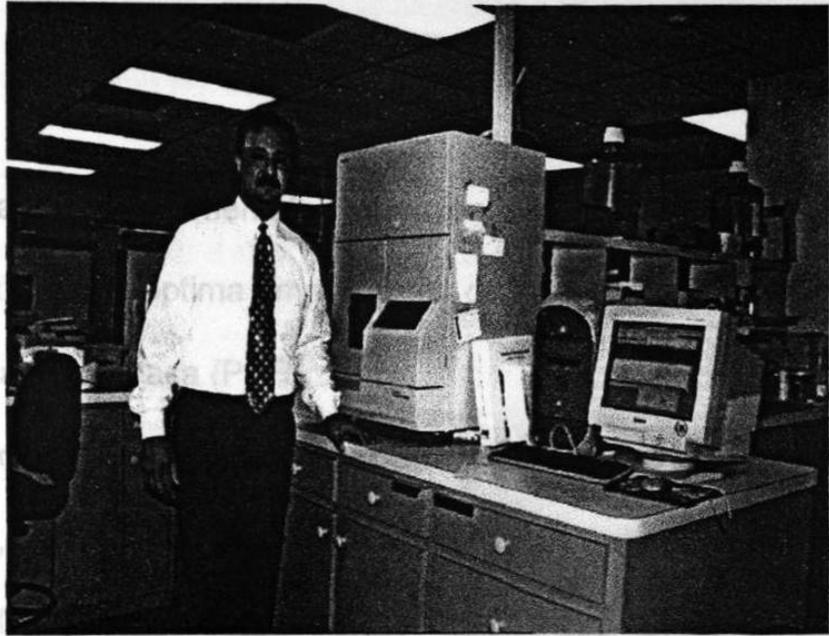


Figura 12. Secuenciador ABI Prism 373A Perkin Elmer

3 RESULTADOS

3.1 Condiciones Experimentales

Los ensayos experimentales permitieron estandarizar las condiciones adecuadas para una óptima amplificación de los microsatélites por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La amplificación de los marcadores BM 1824, BM 2113, SPS 115, ETH 3, ETH 10, ETH 225, TGLA 122 y TGLA 227 se logró con éxito en el laboratorio una vez establecidas las condiciones y parámetros adecuados, realizando PCR múltiple en series de 20 muestras, con la finalidad de evitar pérdidas de reactivos por contaminación o errores de operación.

La resolución de los productos amplificados se realizó en gel de agarosa al 2% con buffer TBE 1x, observándose las bandas por fluorescencia UV de la tinción ligada del Bromuro de Etidio (BE). Cada banda correspondía a un marcador sin definir su condición de homocigoto o heterocigoto debido a la mínima diferencia del tamaño alélico difícil de separar e identificar en este medio, por lo que esta fase únicamente se realizaba con fines de verificación de la amplificación.

Los productos que daban las bandas amplificadas correspondientes a cada marcador fueron comparados con un marcador de peso molecular que servía de referencia para determinar el tamaño aproximado de los mismos y su

consecuente confirmación. Posteriormente fueron enviados al laboratorio de Biopatología Veterinaria de la Universidad de Texas A&M para su resolución final en el secuenciador ABI Prism 373 A (Perkin Elmer).

La calidad del ADN representó un factor determinante en la fidelidad de la amplificación; bajo concentraciones altas o de barrido intenso en su corrimiento de verificación regularmente resultaban bandas inespecíficas, mientras que en concentraciones bajas resultaba en amplificaciones muy tenues que obligaban a repetir la reacción, similar a los casos de resultados nulos de amplificación.

3.2 Concentrado de Resultados

3.2.1 Genotipos en la Raza Brahman:

Los genotipos se distribuyeron en cuatro grupos de acuerdo a la relación de parentesco de los individuos analizados conforme a sus respectivos registros genealógicos.

Grupo 1.- Se conformó por 8 tríos en los cuales el semen y la sangre analizados correspondían a los verdaderos progenitores determinando que el genotipo de la cría fue heredado de ambos progenitores registrados (Tabla VI).

Grupo 2.- Se conformó por 6 tríos en los cuales el genotipo de la cría fue heredado de la progenitora, mientras que el genotipo del progenitor no corresponde en su totalidad con el de la cría, por lo cual se determinó que el semen analizado no correspondía al verdadero progenitor (Tabla VII).

Grupo 3.- Se conformó por 3 tríos en los cuales se confirmó que el genotipo de la cría fue heredado del progenitor, mientras que el genotipo de la progenitora no corresponde en su totalidad con el de la cría, por lo cual se determinó que la sangre analizada no correspondía a la verdadera progenitora (Tabla VIII).

Grupo 4.- Se conformó por 2 tríos en los cuales se confirmó que el genotipo de la cría no correspondía al de ningún progenitor, por lo cual se determinó que las muestras analizadas no correspondían a los verdaderos progenitores (Tabla IX).

Tabla VI

Grupo 1: Tríos que Confirman Paternidad de Ambos Progenitores

MUESTRA	BM 1824	BM 2143	SPS 115	ETH 3	ETH 10	ETH 225	TGLA 122	TGLA 227
C B-I-1	180/182	XX	244/251	112/114	XX	160/160	152/152	76/80
M B-I-10	180/182	XX	XX	110/112	XX	XX	136/152	XX
P B-I-29	180/180	XX	244/251	112/114	215/223	160/160	143/152	77/76
C B-I-9	180/182	XX	XX	114/114	XX	150/156	144/151	76/80
M B-I-28	180/182	XX	XX	XX	XX	XX	136/144	76/76
P B-I-32	178/180	XX	XX	114/114	213/215	150/150	136/151	76/80
C B-I-4	180/180	XX	245/250	XX	XX	158/160	XX	XX
M B-I-20	178/180	XX	245/250	112/114	XX	156/160	XX	80/82
P B-I-31	180/182	XX	XX	112/114	XX	158/160	150/167	XX
C B-I-11	180/180	XX	XX	112/114	XX	160/160	143/165	77/77
M B-I-19	178/180	XX	XX	112/114	XX	160/160	165/165	77/83
P B-I-29	180/180	XX	244/251	112/114	215/223	160/160	143/152	77/77
C B-II-3	180/182	XX	XX	112/114	XX	150/156	144/150	81/80
M B-II-13	180/182	XX	XX	XX	XX	XX	144/144	81/81
P B-II-17	181/182	XX	245/250	112/112	XX	156/160	150/150	80/80
C B-II-4	182/182	XX	245/250	112/112	XX	156/160	144/150	80/80
M B-II-15	182/184	XX	245/251	112/114	XX	160/160	144/152	80/80
P B-II-17	181/182	XX	245/250	112/112	XX	156/160	150/150	80/80
C B-III-9	182/182	142/144	243/250	XX	217/217	152/160	144/144	77/80
M B-III-4	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
P B-III-1	180/182	144/146	243/250	112/114	217/217	152/160	144/165	77/80
C B-III-13	180/182	133/140	250/252	100/112	213/217	150/160	150/151	77/77
MB-III-12	182/182	133/146	250/252	100/112	213/215	156/160	150/152	77/83
P B-III-16	180/182	140/148	250/250	112/114	213/217	147/150	144/151	77/80

C = cría

M = madre

P = padre

En la Tabla II se observa que de acuerdo con los resultados obtenidos no es posible descalificar a ninguno de los padres como los progenitores de la cría.

Tabla VII

Grupo 2. Tríos en los que no Corresponde el Padre

MUESTRA	BM 1824	BM 2119	SPS 115	ETH 3	ETH 10	ETH 225	TGLA 122	TGLA 227
C B-I-2	180/188	XX	XX	114/114	XX	160/160	150/150	76/80
M B-I-21	180/188	XX	XX	112/114	XX	156/160	150/150	76/77
P B-I-30	180/180	XX	XX	114/114	XX	142/160	144/165	82/82
C B-I-15	180/182	XX	XX	114/114	XX	160/160	144/144	77/83
M B-I-24	180/182	XX	XX	XX	XX	XX	144/165	83/83
P B-I-32	178/180	XX	XX	114/114	213/215	150/150	136/151	76/80
C B-II-6	179/182	138/146	243/250	112/112	217/223	150/160	150/150	80/80
M B-II-9	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
P B-II-18	177/180	144/147	243/250	114/114	213/223	150/160	136/144	76/80
C B-II-7	182/182	129/146	250/250	112/112	217/217	156/160	144/150	80/83
M B-II-16	180/182	129/148	250/250	112/114	213/217	150/156	144/144	80/80
P B-II-19	180/182	129/140	XX	114/114	217/217	150/156	144/152	77/80
C B-II-8	180/182	133/140	250/250	114/114	213/215	150/150	136/150	76/80
M B-II-10	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
P B-II-19	180/182	129/140	XX	114/114	217/217	150/156	144/152	77/80
CB-III-10	180/192	146/146	250/250	112/114	215/217	156/156	150/150	76/82
M B-III-5	182/192	133/146	250/250	112/114	217/217	156/160	144/150	77/76
P B-III-14	180/182	137/143	240/240	112/114	217/217	156/160	144/150	77/77

C = cría

M = madre

P = padre

En esta tabla se puede observar que el supuesto padre de la cría registrado no califica como tal, al menos en uno de los marcadores, por ejemplo en el primer trío la cría B-I-2 posee alelos en los marcadores TGLA 122 (150) y TGLA 227 (76-80) que no están presentes en el supuesto padre.

Tabla VIII

Grupo 3. Tríos en los que no Corresponde la Madre

MUESTRA	BM 1824	BM 2113	SPS 115 ⁷	ETH 3	ETH 10	ETH 225	TGLA 122	TGLA 227
C B-I-3	178/180	XX	XX	112/112	XX	XX	136/150	77/77
M B-I-23	178-180	XX	XX	112/114	XX	150/156	150/165	XX
P B-I-31	180-182	XX	XX	112/114	XX	158/160	150/167	XX
C B-I-8	180/182	XX	XX	112/114	XX	142/142	XX	XX
M B-I-18	180/180	XX	XX	112/114	XX	150/161	XX	XX
P B-I-30	180/180	XX	XX	114/114	XX	142/160	144/165	82/82
C B-III-7	180/180	144/146	242/250	112/114	217/217	152/160	144/150	77/80
M B-III-2	178/180	133/145	253/253	112/114	213/217	158/158	149/149	XX
P B-III-1	180/182	144/146	243/250	112/114	217/217	152/160	144/165	77/80

C = cría

M = madre

P = padre

En esta tabla se puede observar que la supuesta madre de la cría registrada no califica como tal, al menos en uno de los marcadores, por ejemplo en el tercer trío la cría B-III-7 no posee alelos en los marcadores BM 2113 (133), SPS 115 (253), ETH 225 (158) y TGLA 122 (149) que están presentes en la supuesta progenitora.

Tabla IX

Grupo 4. Tríos en los que no Corresponde ningún Progenitor

MUESTRA	BM 1824	BM 2148	SPS 115	ETH 3	ETH 10	ETH 225	TGLA 122	TGLA 227
C B-II-5	177/180	140/148	243/250	114/114	225/225	150/150	144/144	77/81
M B-II-12	180/182	133/148	XX	112/114	217/223	150/156	144/152	76/76
P B-II-18	177/180	144/147	243/250	114/114	213/223	150/160	136/144	76/80
C B-III-11	180/182	140/146	242/249	112/114	213/215	150/150	150/167	76/76
M B-III-6	180/180	133/140	250/256	114/114	213/213	150/156	136/144	76/80
P B-III-15	180/180	140/146	250/250	114/114	213/223	150/160	136/144	76/80

C = cría

M = madre

P = padre

En esta tabla se puede observar que los supuestos progenitores de la cría registrada no califican como tal, al menos en uno de los marcadores, por ejemplo en el segundo trío la cría B-III-11 posee alelos en los marcadores SPS 115 (242-249) y TGLA 122 (150-167) que no están presentes en los progenitores registrados.

3.2.2 Genotipos en la Raza Brangus

Considerando que en esta raza se procedió a un muestreo aleatorio, sin estimar una supuesta relación de parentesco se procedió a concentrar los 50 genotipos en un solo cuadro (Tabla X).

Tabla X
Genotipos de la Raza Brangus

MUESTRA	BM ₈₂₄	BM ₂₁₁₃	SPS ₁₁₅	ETH ₃	ETH ₁₀	ETH ₂₂₅	TGLA ₁₂₂	TGLA ₂₂₇
1 BR	182/182	129/146	XX	116/120	214/216	146/148	150/159	77/77
2 BR	178/182	140/146	250/252	114/116	XX	146/160	150/159	XX
3 BR	178/180	135/144	250/260	XX	212/217	148/160	150/159	77/83
4 BR	182/182	129/144	254/260	111/114	215/223	149/152	150/159	77/77
5 BR	178/180	140/146	250/254	114/118	212/217	150/160	150/159	81/97
6 BR	182/182	138/140	250/254	114/118	XX	142/147	150/150	77/87
7 BR	178/188	132/134	256/260	122/124	218/225	153/158	148/150	90/90
8 BR	178/182	146/148	252/260	116/116	216/221	148/160	150/159	77/91
9 BR	178/180	140/148	243/250	118/120	219/223	148/150	150/159	80/96
10 BR	182/188	131/144	255/260	114/116	XX	148/160	150/159	77/91
13 BR	178/178	133/144	260/260	114/114	213/221	148/160	150/160	77/90
15 BR	178/182	129/144	252/260	114/118	213/221	146/148	150/152	77/87
16 BR	182/188	138/146	250/250	114/118	221/225	152/160	159/159	90/96
17 BR	178/180	138/140	250/260	112/122	217/223	142/160	XX	96/96
19 BR	182/182	144/146	249/260	112/114	213/221	146/148	150/150	76/86
20 BR	178/182	144/148	260/260	114/114	213/221	148/152	150/159	76/76
21 BR	178/180	129/144	250/260	XX	221/223	152/152	150/150	XX
22 BR	182/188	144/146	248/249	112/118	221/225	152/160	150/152	76/82
23 BR	179/182	135/149	250/260	113/113	213/223	148/152	146/159	76/96
24 BR	XX	XX	XX	114/118	221/221	148/148	149/159	76/76
25 BR	178/182	129/148	260/260	112/114	221/223	148/160	150/152	76/86
71 BR	179/179	XX	250/260	112/120	221/225	144/152	150/151	76/96
72 BR	178/180	133/146	250/254	118/122	223/225	160/160	150/159	XX
91 BR	179/182	XX	243/250	112/118	223/223	142/160	149/159	XX
92 BR	178/180	XX	250/256	XX	XX	XX	150/150	80/88
93 BR	177/180	XX	243/250	112/118	217/223	146/160	150/150	80/88
96 BR	180/182	134/144	243/250	112/112	223/223	152/161	136/150	76/86
99 BR	179/182	129/131	250/256	XX	XX	XX	136/150	90/96
100 BR	XX	XX	XX	XX	XX	XX	150/152	96/96
36 BR	178/182	144/148	260/262	114/114	213/221	152/152	149/158	76/76
37 BR	182/182	133/144	249/258	116/120	213/213	146/148	XX	76/76
38 BR	178/182	140/144	254/258	XX	221/221	142/148	149/149	76/76
39 BR	182/182	129/140	254/262	112/115	221/221	150/160	150/159	76/92
40 BR	150/150	108/114		112/114	217/221	153/162	150/156	76/96
41 BR	153/157	120/120	227/227	99/102	193/203	133/140	141/153	76/82
42 BR	162/162	120/124	234/240	114/116	213/217	149/162	152/159	76/96

MUESTRA	BM ² 1824	BM ³ 2113	SPS ³ 115	ETH ³ 3	ETH ⁴ 10	ETH ⁵ 225	TGLA ³ 122	TGLA ⁴ 227
43 BR	178/182	140/144	248/262	114/114	213/217	146/148	142/159	76/88
44 BR	182/182	129/137	250/250	114/114	213/217	146/152	150/150	76/76
45 BR	178/182	129/129	250/250	118/118	213/213	162/162	150/150	76/80
46 BR	178/182	140/144	248/258	114/116	221/221	153/162	151/158	76/96
47 BR	178/182	144/146	XX	XX	173/181	108/120	150/150	76/86
48 BR	178/180	144/148	250/258	101/104	193/203	131/133	159/159	76/80
49 BR	182/182	129/146	247/258	91/97	200/202	122/124	150/159	76/76
50 BR	178/182	140/144	254/258	97/97	201/201	122/128	150/150	76/76
52 BR	178/182	129/148	254/262	114/114	221/221	150/153	150/159	76/76
53 BR	182/188	133/133	248/258	XX	213/223	145/160	150/152	76/88
54 BR	182/182	140/146	250/250	112/112	221/223	146/150	152/159	76/86
55 BR	162/162	124/127	230/232	112/118	221/223	150/152	149/158	76/86
56 BR	182/188	133/146	258/262	113/121	213/223	147/160	150/150	76/88
57 BR	182/182	133/148	250/262	113/116	213/221	152/160	149/149	76/76

3.3 Inferencia Estadística

El análisis estadístico de los resultados del presente proyecto se desarrolló empleando fórmulas ajustadas mediante la técnica de Monte Carlo para determinar las diferencias en frecuencias génicas entre razas, considerando las condiciones del tamaño y tipo de muestreo (Usha y col., 1995).

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la inferencia estadística que arrojaron los siguientes parámetros:

- Número y frecuencia de alelos
- Heterocigosidad (H)
- Probabilidad de exclusión (P.E.)
- Contenido de Información de Polimorfismo (PIC).

Estos parámetros son considerados debido a que la capacidad promedio de un sistema de marcadores para excluir y establecer la relación esta condicionada por los genotipos de los parientes reportados; por la frecuencia de ocurrencia de los

marcadores alelomorfos en la raza particular y por el número de sistemas de marcadores independientes probados (Sandberg, 1994).

3.3.1 Número de Alelos

El número de alelos se determinó mediante el conteo directo de las variantes observadas.

Los resultados obtenidos indican que el número de alelos por marcador genético fue mayor en la raza Brangus en comparación con la raza Brahman, observándose una marcada variación entre el número de alelos por marcador en cada raza, siendo en orden ascendente de 4 en ETH 3 a 12 en el BM 2113 para la raza Brahman, mientras que en la raza Brangus fue de 10 en el BM 1824 a 21 en el ETH 225 (Figura 13).

Por otra parte el rango en pares de bases de los alelos encontrados en los marcadores del múltiple 2 en la raza Brangus se muestran en la Tabla XI, siendo aproximado su rango a lo reportado en otras investigaciones de Glowatzki y col. (1995) en *Bos taurus*.

Tabla XI

Cuadro Comparativo del Rango en pb del Múltiple 2

REFERENCIA	ETH 3	ETH 10	ETH 225
Glowatzki	117-129	209-225	140-156
Gómez	91-124	173-225	108-161

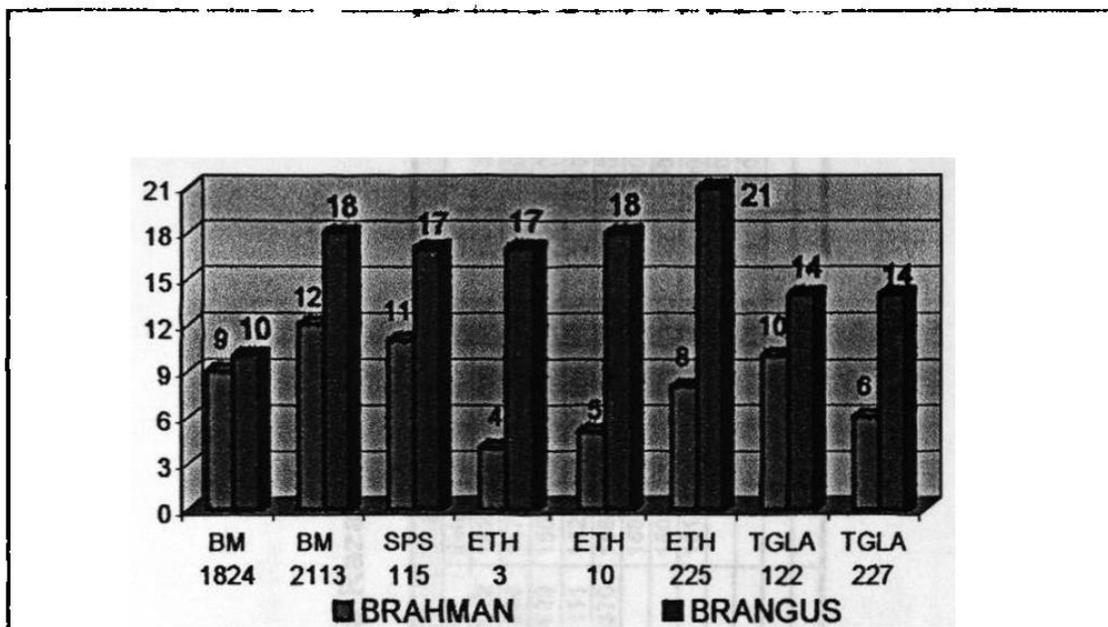


Figura 13. Gráfica Comparativa de Alelos por Marcador Genético entre las Razas Brahman y Brangus

3.3.2 Frecuencia de Alelos

La frecuencia alélica en cada marcador se obtuvo dividiendo el número de observaciones de cada alelo entre el número total de observaciones de todos los alelos (Tablas XII y XIII), la fórmula utilizada fue:

$$F_i = k_i/n$$

F_i = frecuencia del alelo i

k_i = número de observaciones para el alelo i

n = Número total de observaciones

A continuación se agrupan las frecuencias de cada alelo presentes en cada marcador dentro de los resultados obtenidos en cada raza.

Tabla XIII
Frecuencias de 8 Microsatélites en la Raza Brangus

BM 1824			BM 2113			SPS 115			ETH 3			ETH 10			ETH 225			TGLA 122			TGLA 227		
alelo	No.	Pi	alelo	No.	Pi	alelo	No.	Pi	alelo	No.	Pi	alelo	No.	Pi	alelo	No.	Pi	alelo	No.	Pi	alelo	No.	Pi
150	2	.0206	108	1	.0113	227	2	.0222	91	1	.0119	173	1	.0113	108	1	.0112	136	2	.0208	76	39	.4239
153	1	.0104	114	1	.0113	230	1	.0111	97	3	.0357	181	1	.0113	120	1	.0112	141	1	.0104	77	10	.1086
157	1	.0104	120	3	.0340	232	1	.0111	99	1	.0119	193	2	.0227	122	2	.0224	142	1	.0104	80	5	.0543
162	4	.0417	124	2	.0227	234	1	.0111	101	1	.0119	200	1	.0113	124	1	.0112	146	1	.0104	81	1	.0108
177	1	.0104	127	1	.0113	240	1	.0111	102	1	.0119	201	2	.0227	128	1	.0112	148	1	.0104	82	2	.0217
178	24	.2500	129	12	.1363	243	4	.0444	104	1	.0119	202	1	.0113	131	1	.0112	149	8	.0833	83	1	.0108
179	5	.0521	131	2	.0227	247	1	.0111	111	1	.0119	203	2	.0227	133	2	.0224	150	44	.4583	86	6	.0652
180	10	.1042	132	1	.0113	248	4	.0444	112	14	.1666	212	2	.0227	140	1	.0112	151	2	.0208	87	2	.0217
182	40	.4375	133	7	.0795	249	3	.0333	113	4	.0476	213	16	.1818	142	4	.0449	152	7	.0729	88	5	.0543
188	6	.0625	134	2	.0227	250	25	.2777	114	25	.2976	214	1	.0113	144	1	.0112	153	1	.0104	90	5	.0543
			135	2	.0227	252	3	.0333	115	1	.0119	215	1	.0113	145	1	.0112	156	1	.0104	91	2	.0217
			137	1	.0113	254	8	.0888	116	9	.1071	216	2	.0227	146	9	.1011	158	3	.0312	92	1	.0108
			138	3	.0340	255	1	.0111	118	13	.1547	217	8	.0909	147	2	.0224	159	23	.2395	96	12	.1304
			140	11	.125	256	3	.0333	120	4	.0476	218	1	.0113	148	16	.1797	160	1	.0104	97	1	.0108
			144	18	.2045	258	8	.0888	121	1	.0119	219	1	.0113	149	2	.0224						
			146	12	.1363	260	18	.2000	122	3	.0357	221	25	.2840	150	6	.0674						
			148	8	.0909	262	6	.0666	124	1	.0119	223	16	.1818	152	14	.1573						
			149	1	.0113							225	5	.0568	153	4	.0449						
															158	1	.0112						
															160	18	.2022						
															161	1	.0112						

3.3.3 Heterocigosidad

La heterocigosidad indicó el grado de polimorfismo existente en cada par alelico, dado que cada uno proviene de un precursor, esta inferencia origina un criterio de valoración en la proporción de material genético existente en un individuo por herencia de sus progenitores.

La heterocigosidad se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

donde:

P_i = es la frecuencia del alelo i

(Usha y col., 1995; Heyen y col., 1997).

Los marcadores genéticos analizados en las dos razas arrojaron la siguiente heterocigosidad (Tabla XIV y XV).

Tabla XIV

Heterocigosidad de 8 Microsatélites en la Raza Brahman

BM 1824	BM 2113	SPS 115	ETH 3	ETH 10	ETH 225	ΓGLA 122	ΓGLA 227
.6294	.8576	.7155	.5179	.6879	.7328	.7900	.7414

Tabla XV

Heterocigosidad de 8 Microsatélites en la Raza Brangus

BM 1824	BM 2113	SPS 115	ETH 3	ETH 10	ETH 225	ΓGLA 122	ΓGLA 227
.7264	.8855	.8540	.8398	.8380	.8799	.7176	.7764

Se observó mayor heterocigosidad en la raza Brangus a excepción del marcador TGLA 122 que fue mayor en la raza Brahman (Figura 14).

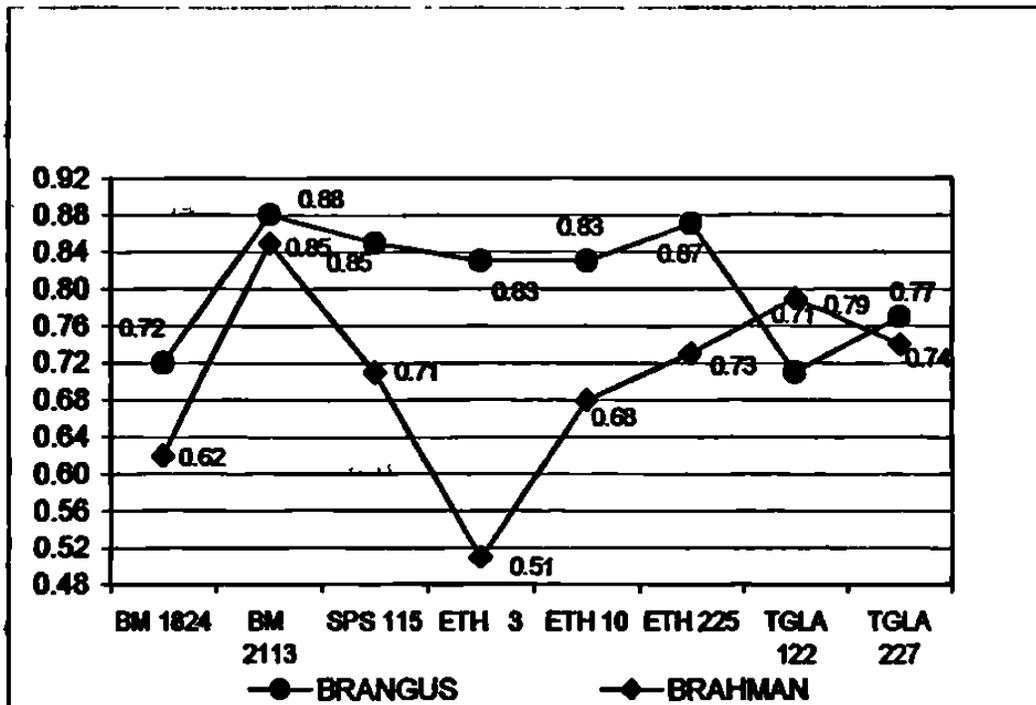


Figura 14. Gráfica Comparativa de Heterocigosidad por Marcador Genético entre las Razas Brahman y Brangus

El marcador ETH 3 tuvo el mas bajo grado de heterocigosidad en la raza Brahman, comparado con los demás marcadores lo que podría indicar su poca utilidad en pruebas de paternidad (Figura 14).

Los valores de heterocigosidad obtenidos en la raza Brahman indican que dentro de los marcadores analizados el ETH 3 y el BM 1824 son los menos informativos, mientras que en la raza Brangus son el el TGLA 122 y el BM 1824.

3.3.4 Probabilidad de exclusión

La probabilidad de exclusión (P.E.) se define como la probabilidad de que un supuesto padre sea excluido como progenitor potencial, asumiendo que el supuesto padre fue elegido al azar.

Se obtuvieron valores de P.E. de cada uno de los marcadores y un valor total de los marcadores combinados en las dos razas. (Tabla XVI y XVII).

La fórmula general de exclusión para n alelos (Jamieson y Taylor, 1997), aplicada a cada marcador en particular fue:

$$P = 1 - 2\sum p_i^2 + \sum p_i^3 + 2\sum p_i^4 - 3\sum p_i^5 - 2(\sum p_i^2)^2 + 3\sum p_i^2 \sum p_i^3$$

La fórmula de probabilidad de exclusión total del conjunto de marcadores (Jamieson y Taylor, 1997) fue:

$$P_E = 1 - (1 - p_1)(1 - p_2)(1 - p_3)\dots\dots\dots(1 - p_k)$$

donde :

P_E = probabilidad de exclusión combinada de un conjunto de marcadores

p = probabilidad de exclusión de cada marcador en particular.

Se observó una probabilidad de exclusión mayor en la raza Brangus en comparación con la raza Brahman, a excepción del marcador TGLA 122 (Figura 15).

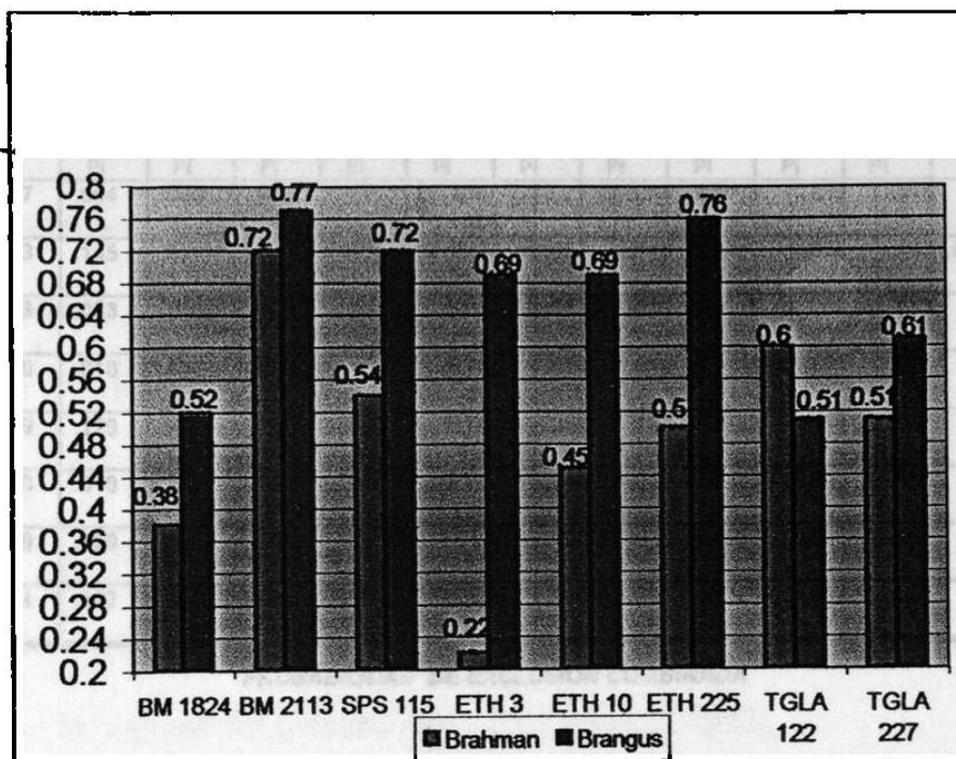


Figura 15. Gráfica Comparativa de Probabilidad de Exclusión por Marcador Genético entre las Razas Brahman y Brangus

Los marcadores con un valor de Probabilidad de Exclusión menor en la raza Brahman son el ETH 3 y el BM 1824 mientras que en la raza Brangus son el TGLA 122 y el BM 1824 (Figura 15).

La Probabilidad de exclusión combinada que se obtuvo de 0.996 en la raza Brahman (Tabla XVI) y de 0.999 en la raza Brangus (Tabla XVII), indica el grado de confiabilidad de este tipo de análisis en pruebas genealógicas, por lo que se alcanza el objetivo principal del presente trabajo de investigación.

Tabla XVI

**Probabilidad de Exclusión Combinada de los 8 Marcadores en la Raza
Brahman**

Marcador	PI	PE											
BM 1824	.027	.064	.009	.509	.018	.324	.009	.018	.018				0.38
BM 2113	.083	.145	.020	.020	.187	.020	.020	.125	.020	.229	.041	.083	0.72
SPS 115	.033	.033	.116	.066	.083	.016	.500	.066	.033	.033	.016		0.54
ETH 3	.020	.010	.408	.561									0.22
ETH 10	.259	.129	.462	.111	.037								0.45
ETH 225	.040	.010	.255	.040	.193	.051	.397	.010					0.50
TGLA 122	.100	.020	.330	.020	.260	.030	.120	.010	.080	.030			0.60
TGLA 227	.184	.293	.358	.032	.065	.065							0.51

PROBABILIDAD DE EXCLUSIÓN COMBINADA

0.996

Tabla XVII

**Probabilidad de Exclusión Combinada de los 8 Marcadores en la Raza
Brangus**

Marcador	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PE														
BM 1824	.02	.01	.01	.04	.01	.25	.05	.10	.44	.06											.52	
BM 2113	.01	.01	.03	.02	.01	.14	.02	.01	.08	.02	.02	.01	.03	.125	.20	.14	.09	.01			.77	
SPS 115	.02	.01	.01	.01	.01	.04	.01	.04	.03	.28	.03	.09	.01	.03	.09	.2	.06				.72	
ETH 3	.01	.03	.01	.01	.01	.01	.01	.16	.04	.30	.01	.11	.15	.04	.01	.03	.01				.69	
ETH 10	.01	.01	.02	.01	.02	.01	.02	.02	.18	.01	.01	.02	.09	.01	.01	.28	.18	.05			.69	
ETH 225	.01	.01	.02	.01	.01	.01	.02	.01	.04	.01	.01	.10	.02	.18	.02	.07	.16	.04	.01	.20	.01	.76
TGLA 122	.02	.01	.01	.01	.01	.08	.46	.02	.07	.01	.01	.03	.24	.01							.51	
TGLA 227	.42	.11	.05	.01	.02	.01	.06	.02	.05	.05	.02	.01	.13	.01							.61	

PROBABILIDAD DE EXCLUSIÓN COMBINADA

0.999

3.3.5 Contenido de Información de Polimorfismo (PIC)

El Contenido de información de Polimorfismo (PIC) nos indicó el grado de variabilidad existente en cada uno de los marcadores genéticos analizados en las dos razas (Tabla XVIII y XIX).

El valor de PIC se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

donde:

P_i es la frecuencia del i -ésimo alelo. (Usha y col., 1995).

En las Tablas XVIII y XIX se muestran los resultados del valor PIC obtenidos en cada raza.

Tabla XVIII

Contenido de Información del Polimorfismo de 8 Microsatélites en la Raza Brahman

BM 1824	BM 2113	SPS 115	ETH 3	ETH 10	ETH 225	TGLA 122	TGLA 227
.9998	.9999	.9996	.9493	.9686	.9996	.9999	.9926

Tabla XIX

Contenido de Información del Polimorfismo de 8 Microsatélites en la Raza Brangus

BM 1824	BM 2113	SPS 115	ETH 3	ETH 10	ETH 225	TGLA 122	TGLA 227
.9983	.9996	.9999	.9998	.9990	.9999	.9990	.9990

Los resultados obtenidos indican que los marcadores con un valor ligeramente inferior del PIC son el ETH 3 para la raza Brahman y el BM 1824 para la raza Brangus, sin embargo al comparar con los valores reportados por Glowatzki y col. (1995) en *Bos taurus*, los valores de PIC en el múltiple 2 son superiores (Tabla XX).

Tabla XX

Cuadro Comparativo del PIC del Múltiple 2

Referencia	ETH3	ETH10	ETH225
Glowatzki	.62	.63	.70
Gómez	.99	.99	.99

3.3.6 Comparación de Resultados

Con el resultado de estos cuatro parámetros se estimó el valor de cada locus y de todos los loci en conjunto en la verificación de la genealogía de las razas estudiadas, determinando que el panel de marcadores analizados es informativo a excepción del ETH 3 en la raza Brahman, el TGLA 122 en la raza Brangus y el BM 1824 en ambas (Tabla XXI).

Al comparar el rango de alelos de cada marcador se observa que conforme aumenta el tamaño en pares de bases, produce un efecto similar sobre el valor de Heterocigosidad y P.E.(Tabla XXI).

Tabla XXI

**Cuadro Comparativo de los Parámetros Génicos
entre las dos Razas**

Marcador	Raza	N*	# de alelos	Rango de tamaño	Heterocigosidad	PIC	PE
BM 1824	Brahman	108	9	177-192	.62	.99	.38
	Brangus	96	10	150-188	.72	.99	.52
BM 2113	Brahman	48	12	129-148	.85	.99	.72
	Brangus	88	18	108-149	.88	.99	.77
SPS 115	Brahman	60	11	140-156	.71	.99	.54
	Brangus	90	17	227-262	.85	.99	.72
ETH 3	Brahman	98	4	100-114	.51	.94	.22
	Brangus	84	17	91-124	.83	.99	.69
ETH 10	Brahman	54	5	213-225	.68	.96	.45
	Brangus	88	18	173-225	.83	.99	.69
ETH 225	Brahman	98	8	142-161	.73	.99	.50
	Brangus	89	21	108-161	.87	.99	.76
TGLA 122	Brahman	100	10	136-167	.79	.99	.60
	Brangus	96	14	136-160	.71	.99	.51
TGLA 227	Brahman	92	6	76-83	.74	.99	.51
	Brangus	92	14	76-97	.77	.99	.61

Si se establece la eliminación de los marcadores ETH 3 en la raza Brahman y TGLA 122 en la raza Brangus, así como el BM 1824 en ambas por tener un bajo valor de P.E. en comparación con el resto de los marcadores; aún así se obtiene una P.E. combinada de 0.993 y 0.999 para cada una de las razas respectivamente; la cual cumple con el objetivo de esta investigación.

En la raza Brangus se encontraron valores superiores en el número de alelos y PIC comparados con lo reportado por Heyen y col. (1997) en la raza Angus, aún cuando el número de muestras son casi similares y los valores de Heterocigosidad y P.E. no están muy distantes (Tabla XXII).

Tabla XXII

Comparación de Resultados del Múltiple 3 en la Raza Brangus con el Reporte de Heyen y col. (1997) en la Raza Angus

Marcador	Referencia	N°	# de alelos	Rango de tamaño	Heterocigosidad	PIC	PE
TGLA122	Heyen	43	6	141-173	.72	.67	.47
	Gómez	50	14	136-160	.71	.99	.51
TGLA227	Heyen	60	7	80-96	.81	.79	.63
	Gómez	50	14	76-97	.77	.99	.61

4 DISCUSIÓN

Esta investigación se facilitó por la disponibilidad pública de los iniciadores de PCR correspondientes a cada microsatélite recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal. Se desarrolló la amplificación múltiple de PCR, lo cual requirió de una estandarización de las condiciones adecuadas, debido a su diferencia comparada con la amplificación simple de un locus.

Para la optimización de resultados coincidimos con lo propuesto por Henegariu y col. (1997) en la recomendación de mantener condiciones de control de calidad en la manipulación de equipo, reactivos y ADN, debido a que esto puede originar fallas en la amplificación que en ocasiones confunden y motivan a cambiar las condiciones y parámetros de la reacción que estaban correctas.

La realización del PCR múltiple como lo propone Henegariu, permitió reducir el costo y el tiempo de la reacción, logrando hacer más eficiente la técnica.

En los resultados obtenidos se confirmó lo reportado por Weber (1990), en el sentido de que los marcadores de tipo microsatélites son más informativos en los parámetros de heterocigosidad y probabilidad de exclusión cuando su rango de tamaño es más amplio, esto lo confirmamos con las variantes alélicas por tamaño de pares de bases, donde los microsatélites de mayor rango arrojaban mayor probabilidad de exclusión y heterocigosidad (Tabla XXI).

La probabilidad de exclusión de 0.99 que se obtuvo en los 6 marcadores más informativos de cada raza coincide con lo reportado por Holm y Bendixen (1996).

4.1 Tipificación por PCR Múltiple de BM 1824, BM 2113 y SPS 115

En la amplificación de este primer PCR múltiple, se observó una diferencia de temperatura de hibridación de los iniciadores, la cual disminuyó 2°C de su condición individual a la reacción múltiple; el marcador SPS 115 en algunas reacciones no se observó, probablemente se debió a la confusión del colorante fluorescente del producto amplificado con el del marcador interno utilizado en el secuenciador.

Las condiciones y parámetros descritas en el capítulo de materiales y métodos son las que permitieron un mejor resultado de amplificación.

En este múltiple los marcadores más informativos para las dos razas fueron el BM 2113 y el SPS 115, ya que sus valores de Heterocigosidad y Probabilidad de Exclusión fueron los más altos del panel analizado.

El marcador menos informativo de este múltiple, fue el BM 1824 ya que manifestó baja Heterocigosidad y Probabilidad de Exclusión en ambas razas en comparación con los demás marcadores analizados.

4.2 Tipificación por PCR Múltiple de ETH3, ETH 10 y ETH 225

La amplificación de este segundo múltiple se realizó por combinación de un PCR dúplex y un PCR simple, esto debido a que la limitada cantidad de reactivos no permitió una estandarización completa del PCR en forma múltiple total.

El marcador ETH 3 fue amplificado en PCR simple, mientras que los marcadores ETH 10 y ETH 225 se amplificaron en condición múltiple, reduciendo su temperatura de emparejamiento 1°C de su condición simple.

Una vez obtenidos los productos, estos fueron combinados y se verificó su amplificación en gel de agarosa al 2% en buffer de TBE 1x.

Las condiciones y parámetros que arrojaron una amplificación de mayor intensidad se describieron en el capítulo de materiales y métodos.

En este múltiple los tres marcadores fueron informativos para la raza Brangus debido a que presentaron mayor frecuencia alélica, lo cual originó valores altos de Probabilidad de Exclusión (P.E.) y Contenido en Información de Polimorfismo (PIC), mientras que el marcador menos informativo únicamente para la raza Brahman fue el ETH 3, debido que presentó pocas variantes alélicas arrojando un valor bajo de PIC y P.E., por lo cual se recomienda su sustitución por otro marcador más polimórfico.

En el marcador ETH 225 se encontraron 8 alelos en la raza Brahman y un valor de PIC de 0.9996 a diferencia de lo reportado por Steffen y col.,(1993) en *Bos indicus* donde se encontraron 6 alelos y un valor de PIC de 0.77.

En la raza Brangus originada por el cruzamiento de *Bos indicus* y *Bos taurus* se encontró una diferencia mayor en el rango de alelos y valor de PIC en

comparación a lo reportado en ganado *Bos taurus* por Glowatzki-Mullis y col., (1995) (Tabla XI y XX).

4.3 Tipificación por PCR Múltiple de TGLA 122 y TGLA 227

La amplificación de este duplex de PCR se realizó sin contratiempos, la temperatura de emparejamiento en el PCR múltiple disminuyó 2°C de la temperatura requerida para la amplificación simple. Los parámetros y condiciones adecuadas para la amplificación se describen en el apartado de materiales y métodos; los resultados obtenidos muestran valores estándar en la Heterocigosidad del TGLA 122 y bajos en el TGLA 227 para ambas razas, sin embargo la P.E. de los dos marcadores es alta en la raza Brahman mientras que únicamente el TGLA 227 muestra un valor alto para la raza Brangus.

Al comparar los resultados obtenidos en la raza Brangus con los que reporta Heyen y col. (1997), para la raza Angus se encontraron diferencias de mayor número de alelos y valor de PIC para la raza Brangus, es muy probable que esto se deba a su origen híbrido; sin embargo, el valor de heterocigosidad es ligeramente mayor en la raza Angus (Tabla XXII).

Considerando que los valores de Heterocigosidad y P.E. no están muy alejados de los ya reportados se recomienda la utilización de este duplex para fines de filiación.

4.4 Probabilidad de Exclusión Total

Heyen en 1997 analizó 22 marcadores microsatélites en 6 razas de ganado bovino europeo y reportó un rango de 0.06 a 0.77 de probabilidad de exclusión y un promedio de 0.42, en el caso nuestro en las 2 razas analizadas encontramos un rango de 0.22 a 0.77 y un promedio de 49.5 lo cual nos indica que el panel de marcadores elegido es confiable para la genotipificación a reserva de incrementar estos valores al sustituir los marcadores sugeridos anteriormente por otros de mayor polimorfismo.

Con los resultados obtenidos se confirma lo propuesto por las investigaciones de Heyen y col., 1997; Mommens y col., 1998; Usha y col., 1995 y Vankan y col., 1999; en el sentido que los microsatélites se han constituido actualmente como herramientas útiles para el control del pedigrí y estudios genéticos de poblaciones en animales domésticos.

5 CONCLUSIÓN

Los programas de selección en el mejoramiento genético del ganado, requieren de una identificación precisa, de manera que permita establecer líneas genealógicas que respalden la seguridad de pedigrí que estimen valores de cría individuales.

Esta prueba resulta de gran importancia en la identificación exacta de los animales al proporcionar seguridad en los registros genealógicos, con lo cual se evitaría la operación comercial fraudulenta, más aún cuando se generaliza el empleo de la inseminación artificial y la transferencia de embriones en donde los progenitores no están físicamente presentes en los hatos y pudieran ocurrir errores en la asignación de la paternidad a aquellos individuos que constituirían el pie de cría, lo que impactaría en la composición genética de una población bovina tal como lo propone Caldwell, 1986; Glowatzki-Mullis y col., 1995; y Williams y col., 1997.

Al lograr aplicar esta técnica como un medio de agregar información única e irreproducible a las cédulas de identidad individual en el registro de animales de gran potencial genético, se obtiene un confiable certificado genealógico, que funcionaría como documento de identidad para fines de salvaguardar la propiedad del animal, así mismo se puede considerar una valiosa herramienta genética en la

selección de animales para el establecimiento de poblaciones con características productivas deseadas.

Con el análisis de la variabilidad de éste panel de 8 marcadores genéticos de tipo microsatélites en las razas bovinas Brahman y Brangus, se cumplió con los objetivos planteados, considerando que:

1.- Se estandarizaron las condiciones y parámetros requeridos para implementar la metodología de laboratorio requerida en la genotipificación por marcadores STR's.

2.- Se determinó la frecuencia génica de 8 microsatélites, recomendados internacionalmente, en la población sujeta al estudio de la región noreste de México.

3.- Se calculó el contenido de información de polimorfismo y la heterocigosidad de cada uno de los 8 microsatélites, lo que permitió conocer la respectiva variabilidad para fines de filiación.

4.- Se obtuvieron los valores de la probabilidad de exclusión individual y combinada, que ayudaría a definir el margen de error al utilizar la genotipificación para asignación de parentesco.

5.- Los resultados obtenidos permitieron inferir que los marcadores más informativos dentro del panel analizado para la raza Brahman fueron el BM 2113, el SPS 115, el TGLA 122 y el ETH 225; mientras que para la raza Brangus fueron los marcadores BM 2113, SPS 115, ETH 3, ETH 225, ya que sus valores de Heterocigosidad y Probabilidad de Exclusión fueron los más altos, por otra parte los marcadores ETH 10 y TGLA 227, aunque arrojaron valores menores a los anteriores, pueden considerarse útiles para fines de filiación en ambas razas.

6.- El poder de exclusión de los marcadores ETH 3 para la raza Brahman, TGLA 122 para la raza Brangus y BM 1824 para ambas, indican que no representan ser informativos, por lo que se recomienda su remplazo por otros STR's de mayor polimorfismo.

7.- La estimación de la frecuencia alélica, la heterocigosidad y la probabilidad de exclusión fue más alta en la raza Brangus comparado con la raza Brahman, probablemente es debido a la interacción alélica más intensa existente en los híbridos.

En conclusión, los microsatélites analizados representan una eficiente herramienta de identificación de individuos que por su seguridad y aplicación puede sustituir al método convencional de tipificación sanguínea; sin embargo es necesario continuar la investigación de otros loci de STR's para lograr mayor aplicación.

REFERENCIAS

- Amigues, Y., Mariat, D., Gaudy, V. y Boscher, M.Y. 1996. Duplex amplification of six microsatellites for paternity testing in canine species. Animal Genetics 27 (supl. 2):28.
- Aznar, M.P., Osta, R., Martin-Burriel, I., y Zaragoza, P. 1996. Evaluation of microsatellites for parentage identification in dogs. Animal Genetics 27 (supl. 2):28-29.
- Barret, M.A., Larkin, P.J. 1979. Producción lechera y de carne de res en los trópicos. Edit. DIANA, México, D.F.
- Bates, S., Holm, T., Van, Haeringen, H., Lange, K., Ziegle, J., Heyen, D., Da, Y., y Lewin, H. 1996. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for automated parentage verification Animal Genetics 27 (Suppl. 2):18.
- Caldwell, J. 1986. Blood types of cattle and their application. En: Morrow, D.A. Current Therapy in Theriogenology, 2nd. Edition, section V: Bovine. Saunders Co., Philadelphia, U.S.A.
- Caldwell, J. 1996. DNA and ancestry verification. World Holstein-Friesian Conference, Japan, September 1996. Tomado de página en Internet de ImmGen, Inc. (<http://www.immgen.com/japan.html>).
- Enríquez, González C. 1995. Ganado Vacuno, exterior, razas y calificación. pp 190-213. Editado por Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.
- Ellis, T.H.N. 1986. Restriction fragment length polymorphism markers in relation to quantitative characters. Theor. Appl. Genet. 72:1-2.
- Fraser, Allan. 1981. Cría y Explotación del Ganado Bovino pp 97-119. Edit. CECSA 11a. Impresión.
- French, M.H. 1975. Razas Europeas de Ganado Bovino. Pag. 452. FAO 2a. Imp.
- Fries, R., Eggen, A., y Womack, J.E. 1993. The bovine genome map. Mammalian Genome 4: 405-428.
- Fries, R.; Eggen, A.; y Womack, J.E. 1993. The bovine genome map. Mammalian Genome 4:405-428

- Georges, M., Gunawardana, A., Threadgill, D.W., Lathrop, M., Olsaker, I., Mishra, A., Sargeant, L.L.S., Schoeberlein, A., Steele, M.R., Terry, C., Threadgill, D.S., Zhao, X., Holm, T., Fries, R., y Womack, J.E. 1991. Characterization of a set of variable number of tandem repeat markers conserved in Bovidae. Genomics 11: 24-32.
- Glowatzki-Mullis, M.-L., Gaillard, C., Wigger, G. y Fries, R. 1995. Microsatellite-based parentage control in cattle. Animal Genetics 26: 7-12.
- Griffiths, J.F.; Gelbart, M.; Miller, J.; y Lewontin, R. 2000. *Genética Moderna*. pp. 26-30 Edit. Mc Graw-Hill.
- Gros, P., Skaemene E., y Forget, A. 1981. Genetic control of natural resistance to mycobacterium bovis (BCG) in mice. J. Immunol. 127: 2417-2421.
- Grosclaude, F., Alaux, M.T.; Houlier, G.; y Guerin, G. 1981. The C system of cattle blood groups additional features in the system. An. Blood Groups Biochem Genet. 12(1):7.
- Henegariu, O.; Heerema, N.A.; Dlouhy, S.R.; Vance, G.H.; y Vogt, P.H. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol BioTechniques 23:504-511.
- Heyen, D.W., Beever, J.E., Da, Y., Evert, R.E., Green, C., Bates, S.R.E., Ziegler, J.S. y Lewin, H.A. 1997. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. Animal Genetics 28: 21-27.
- Hohenhorst, J., Fries, R., Vogeli, P. y Stranzinger, G. 1994. Use of microsatellites for parentage control in pigs. Animal Genetics 25 (supl.2):33.
- Holm, L.-E. y Bendixen, C. 1996. Usefulness of microsatellites from the ISAG comparison test for parentage control in Danish Black-and-White cattle. Animal Genetics 27 (supl. 2):21.
- Jamieson A.; Taylor St.C.S. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. Animal Genetics 28:397-400.
- Jeffreys, G. 1985. Families of Hypervariable Minisatellites. Animal Genetics, 16: 5-20.
- Karp, G. 1996. Biología Celular y Molecular. pp. 742-744 edit. McGraw Hill.
- Larsen, B. 1982. On the bovine F blood groups system. An. Blood groups Biochem. Genet. 13(2):115.

- Malo, D.; Vidal S. M.; Hu, J.; Skamene, E.; y Gros, P. 1973. High-Resolution linkage map in the vicinity of the host resistance locus *bcg*. Genomics 16:655-663.
- Miller, S.A.; Dykes, D.D.; y Polesky, H.F. 1988. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Research 16:1215.
- Mommens, G.; Van Zeveren A.; y Peelman, L.J. 1998. Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity cases in American bison, *Bison bison* L. Animal Genetics 29:12-18.
- Mullis, K. y Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 55: 335-350.
- O'Brian, S.J., Womack, J.E., Lyons, L.A., Moore, K.J., Jenkins, N.A. y Copeland, N.G. 1993. Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. Nature Genetics 3:103-112.
- Oldenbroek, J.K. y Bouw, J. 1974. Further studies on the relation between the F and N' blood groups system in cattle. An. Blood groups Biochem. Genet. 6:81.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Honn, G. T.; Mullis, K.B. y Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. SCIENCE 239:487-491.
- Sandberg, K. 1994. Guidelines for the interpretation of blood typing tests in horses. Workshop on Thoroughbred Blood Typing Standardization. 24th International Conference on Animal Genetics. Prague, Czech Republic.
- Simpson, S.P. 1989. Detection of linkage between quantitative trait loci and restriction fragment length polymorphism using inbred lines. Theor. Appl. Genet. 77:815-819.
- Smith, C. y Simpson, S.P. 1986. Use of genetics polymorphisms in livestock improvement. J. Anim. Breed Genet. 103:203-217.
- Stach, J.L.; Gros, P.; Forget, A. y Skamene, E. 1984. Phenotypic expression of genetically controlled natural resistance to mycobacterium bovis (BCG) J. Immunol. 132:888-892.
- Steffen, P.; Eggen A., Dietz A. B., Womack J. E., Stranzinger G., Fries R. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. Animal Genetics 24:121-124.
- Stormont, C. 1982. Blood Groups in Animals. JAVMA 181 (10): 1120

- Usha, A.P., Simpson, S.P. y Williams J.L. 1995. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. Animal Genetics 26: 155-161.
- Vankan, D.M. y Faddy, M.J. 1999. Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite análisis of múltiple-sire matings Animal Genetics 30:355-361.
- Vizcarra, Sifuentes O. 1975. El Cebú en México. pp. 21-63. Edit. B. Acosta- AMIC 2a. Edición. México, D.F.
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. y Zoller, M. 1992. Recombinant DNA 2nd edition, W.H. Freeman and Company, New York, N.Y., USA.
- Weber J. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphisms. Genomics :524-530
- Wilkie, P.J., Krizman, D.B., y Weber, J.L. 1992. Linkage map of human chromosome 9 microsatellite polymorphisms. Genomics 12: 607-609.
- Williams,J.L.; Usha A.P.; Urquhart,B.G.D. y Kilroy,M. 1997. Verification of the identity of bovine semen using DNA microsatellite markers.The Veterinary Record 140:446-449.
- Ziegle,J.S.; Ying,S.; Corcoran, K. P.;Nie, L.; Mayrand, E. P.; Hoff, L. F.; McBride, L. J.; Kronick, M. N. y Diehl, S. R. 1992. Application of Automated DNA Sizing Technology for Genotyping Microsatellite Loci. Genomics 14:1026-1031.

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

Recomendaciones:

Con la finalidad de optimizar los resultados se recomienda:

- Las soluciones preparadas deben someterse a esterilización a 121°C (15 lb/in²) durante 15 minutos.
- Toda manipulación de material, reactivos y muestras debe realizarse con guantes
- Para reducir pérdidas por contaminación, trabajar con alícuotas pequeñas de cada reactivo.
- Limpiar pipetas y campana frecuentemente.
- Homogenizar perfectamente cada reactivo descongelado y previo a su utilización.

Preparación de soluciones y reactivos:

A continuación se describen las fórmulas y procedimientos necesarios para la realización de las soluciones y reactivos utilizados en el laboratorio.

Buffer de Jugo Azul 6x.

(azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%)

Se disuelve en 5 ml de agua UPE 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 ml de glicerol; aforar a 10 ml.

Buffer para aislamiento de ADN a partir de espermias.

(Tris-HCl 100 mM, NaCl 500mM, EDTA 10 mM, SDS 1%, Mercaptoetanol 2%)

En 7 ml de agua UPE agregar 2 ml de Tris-HCl 1M, 10 ml de NaCl 1M, 0.4 ml de EDTA 0.5M, 2 ml de SDS 10% y 0.4 ml de mercaptoetanol. Homogenizar perfectamente al agregar cada ingrediente.

Buffer para lavado de semen.

(NaCl 150 mM, EDTA 10 mM)

En 166 ml de agua UPE agregar 30 ml de NaCl 1M y 4 ml de EDTA 0.5M (pH 8.0) homogenizar perfectamente.

Buffer para lisis de eritrocitos.

(NH₄Cl 155 mM, NaHCO₃ 10 mM, EDTA 0.1 mM (pH 7.4))

En 7.75 ml de NH₄Cl 1 M, agregar 0.5 ml de NaHCO₃ 1 M y 0.01 ml de EDTA 0.5M., mezclar perfectamente y aforar a 50 ml con agua UPE.

Buffer para lisis de leucocitos.

(Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM pH 8.0)

En 20 ml de NaCl 1M, agregar 0.5 ml de Tris-HCl 1M y 0.2 ml de EDTA 0.5M. Homogenizar perfectamente y aforar a 50 ml con agua UPE.

Buffer TBE 10x pH 8.0

(Tris-Borato 0.9M, EDTA 0.02 M)

En 800 ml de agua bidestilada agregar 7.4448 g de EDTA, nivelando el pH a 8.0, agregar 108 g de Trizma base y 55 g de Acido bórico, homogenizar perfectamente y aforar a 1000 ml, esterilizar.

Buffer TBE 1x

En 900 ml de agua bidestilada agregar 100 ml de TBE 10x y agitar vigorosamente.

Buffer TE 100x

(Tris-HCl 1M, EDTA 100 mM)

Mezclar 25 ml de Tris-HCl 2M pH 8.0, con 10 ml de EDTA 0.5M pH 8.0 y aforar a 50 ml con agua UPE y esterilizar.

Buffer TE 1X

Mezclar 99 ml de agua UPE con 1 ml de buffer TE 100x y esterilizar.

Gel de agarosa al 0.8 y 2%

Agregar 0.8 g ó 2 g de agarosa según corresponda, en 100 ml de TBE 1x y calentar, manteniendo en ebullición por 30 seg.

SDS 10%

Disolver 10 g de SDS en 100 ml de agua UPE, calentando a 37°C en el termoagitador hasta disolver los sólidos.

Solución de Tinción con Bromuro de Etidio (0.1%)

Se agrega 20 μ l de Bromuro de Etidio (10 mg/ml) en 200 ml de Agua Bidestilada.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Juan Carlos Gómez De la Fuente

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Producción Animal

Tesis: 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

Campo de Estudio : Producción Animal

Biografía :

Datos Personales : Nacido en Ciudad Victoria, Tamaulipas el 8 de Junio de 1966, hijo de Ramiro Gómez Sánchez e Idalia De la Fuente Saldívar.

Educación : Egresado de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, grado obtenido Médico Veterinario Zootecnista en 1988.

Experiencia Profesional :

Institución : Secretaría de Educación, Cultura y Deporte del Estado de Tamaulipas. Profesor de Enseñanza Agropecuaria

Periodo : 1989-1997

Institución : Maestro por Horas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Técnico laboratorista asistente de Investigación en la Unidad de Biotecnología Animal; Coordinador del Departamento Escolar, Médico de Servicio.

Periodo : Febrero de 1999 a la Fecha.



