

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA**



**DETERMINACION DEL NUMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS  
GENICAS DE MICROSATELITES DE ADN EN LAS RAZAS BOVINAS  
HOLSTEIN FRIESIAN Y SIMMENTAL EN EL NORESTE DE MEXICO**

**POR**

**JOSE MARIA GARZA LOZANO**

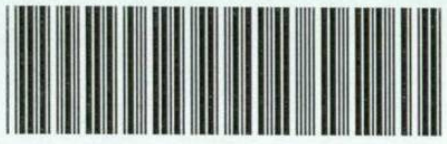
Como requisito parcial para obtener el grado de  
**MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS**  
con Enfoque en Producción Animal

**JUNIO 2002**

J.M.G.I.L.

2

TM  
SF199  
.H75  
G37  
c.1



1080116300

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA



DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS  
ALÉlicas DE MICROSATELITES DE ADN EN LAS RAZAS BOVINAS  
FRISESE FRIESIAN Y SIMMENTAL EN EL NORESTE DE MEXICO

POR

JOSE MARIA GARZA LOZANO

Caso requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
con Énfasis en Producción Animal

JUNIO 2002

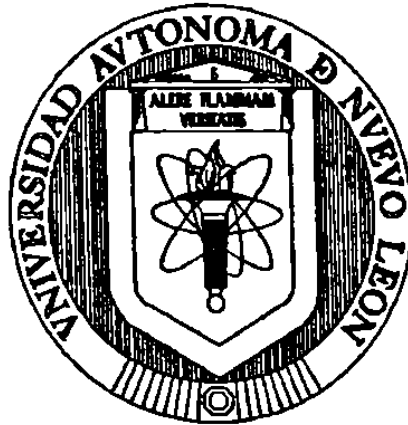


T.M.  
SF 199

.H75  
G37



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



**DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GÉNICAS  
DE MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS BOVINAS  
HOLSTEIN FRIESIAN Y SIMMENTAL  
EN EL NORESTE DE MÉXICO**

**POR**

**JOSÉ MARÍA GARZA LOZANO**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
con Énfasis en Producción Animal**

**JUNIO, 2002**

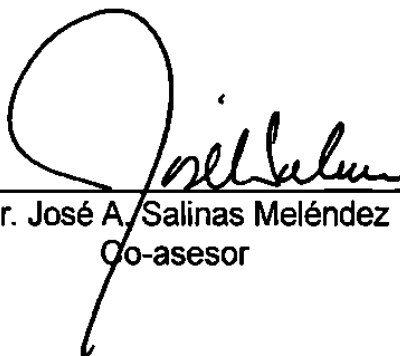
**DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GÉNICAS  
DE MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS BOVINAS  
HOLSTEIN FRIESIAN Y SIMMENTAL  
EN EL NORESTE DE MÉXICO**

APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE TESIS:



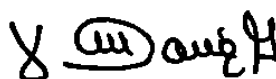
---

Ph.D. Víctor M. Riojas Valdés  
Asesor de la tesis



---

Dr. José A. Salinas Meléndez  
Co-asesor



---

Dr. Alfredo Wong González  
Co-asesor



---

Ph.D. Rafael Ramírez Romero  
Co-asesor

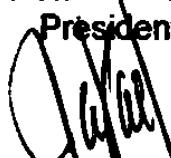
**DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GÉNICAS  
DE MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS BOVINAS  
HOLSTEIN FRIESIAN Y SIMMENTAL  
EN EL NORESTE DE MÉXICO**

**APROBACIÓN DE LA TESIS**



---

**Ph.D. Víctor M. Riojas Valdés  
Presidente**



---

**Ph. D. Rafael Ramírez Romero  
Secretario**



---

**Dr. Alfredo Wong González  
Vocal**



---

**Ph. D. Gustavo Hernández Vidal  
Secretario de Post-grado e Investigación**



## **DEDICATORIA**

**A mis padres José María, María del Socorro y por supuesto a mi ma. (Hilda). Ya que gracias al ejemplo de valor y entereza que me inculcaron, mi Padre y mi Ma, logre terminar un objetivo mas de mi vida.**

**A mi esposa Norma Luz por comprenderme durante todo este tiempo, mi mal humor, mi cansancio, ya que sin tu amor y apoyo no lo hubiera logrado. Gracias Lucha**

**A mis hijos Tadeo y Ovidio, por comprenderme el que los haya privado que saliéramos a divertimos a muchos lugares. Ya que sin el amor de ustedes no lo hubiera logrado.**

**A mis hermanos Herminia, Socorro, Olivia, Enriqueta, Maria Otilia, Maria Hilda. José María por el apoyo que me brindaron para seguir adelante.**

**A mi compadre Lic. Crecencio Salinas Salinas por el apoyo y amistad que me dio durante el tiempo que duró esta investigación.**

**A mis cuñadas Guadalupe Dolores, San Juana, por ayudarme y comprenderme y que me estimularon a seguir adelante.**

**A mis cuñados José Luis, Fernando, Enock, Federico, Cesar, Ovidio y Víctor que de una u otra forma me apoyaron.**

**A todos mis sobrinos: Pepe, Ana, Alejandra, Jessica, Fernando, Iván, Alan, Daphne, Sari, Karla, Karina, Karen, Katia, Lily, toño, Hortensia, Belem, Paola, Ovidio y Yolis, sin olvidar al los tremendos Carlos y Víctor.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por haberme dado la oportunidad de disfrutar, el término de este trabajo junto con mis familiares y amistades.

Al Dr. Víctor Manuel Riojas Valdés por tu paciencia y consejos que me diste para por poder llevar a cabo el término de este trabajo, pero ante todo gracias por brindarme tu amistad. Gracias Víctor.

Al Dr. José Antonio Salinas Meléndez por la oportunidad que me brindaste para que yo pudiera lograr el término de este trabajo, pero sobre todo la amistad que me brindaste de manera desinteresada. Gracias Toño

Al Dr. Rafael Ramírez Romero por todo el apoyo que estoy teniendo últimamente para poder llevar a cabo el término de este trabajo así como también por toda la confianza que ha depositado en mi, y el de su amistad. Gracias Doc.

Al Dr. Alfredo Wong González por su labor académica como maestro de la maestría, su apoyo y amistad desinteresada que me brindo para llevar a cabo el termino de este trabajo. Gracias Alfredo.

Al MVZ. José Nicolás de Tellitu S. por su amistad y consejos que me dio a cada momento. Gracias Tello.

Al Dr. James Derr, del Departamento de Patología, Fac. de Medicina Veterinaria, Universidad de Texas A & M, por su colaboración en la genotipificación de las muestras.

Al Ing. Ciro Efrén Barrera Hinojosa, del Departamento de Estadística de la Fac. de C. Biológicas, U.A.N.L., por su Valiosa ayuda en el Análisis Estadístico.

Al MVZ. MC. Juan Carlos Gómez de la Fuente por los consejos y amistad, así como la ayuda que me diste pare que pudiera llevar a cabo el término de esta investigación.

A la MVZ. Alicia Guadalupe Marroquín por su valiosa ayuda como auxiliar de laboratorio. Gracias Alicia.

A la PMVZ. Bárbara Carballo por tu valiosa ayuda que me prestaste para lograr el termino de esta investigación. Gracias Bárbara.

A todos mis maestros de la Maestría ya que gracias a sus enseñanzas logré llegar al término de un objetivo mas de mi vida.

A todos los compañeros que laboran en la Facultad tanto Académicos como Administrativos, que de una u otra forma me ayudaron a lograr terminar este trabajo. Gracias.

**A todos los alumnos de la Licenciatura, que de una forma u otra me ayudaron a terminar esta investigación. Gracias.**

**A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por haberme dado la oportunidad de llegar a ser algo en esta vida, ya que sin el apoyo que me brindó en los últimos 22 años no hubiera logrado este objetivo.**

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página	
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Registros de Pedigrí	2
1.1.1	Identificación Permanente	3
1.1.2	Identificación No Permanente	3
1.2	Técnicas de Laboratorio usadas para la Identificación de los animales	5
1.2.1	Tipificación sanguínea	5
1.2.2	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	6
1.3	Estructura del ADN	7
1.3.1	ADN Estructural no Codificante	8
1.3.2	ADN Satélite	8
1.3.3	ADN Minisatélites	9
1.3.4	ADN Microsatélite	9
1.4	Microsatélites recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (SIGA)	11
1.5	Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)	13
1.5.1	Procedimiento de la técnica RCP	13
1.5.2	Etapas de la Técnica RCP	14
1.5.2.1	Desnaturalización	14
1.5.2.2	Hibridación de Iniciadores	14
1.5.2.3	Síntesis de ADN	15
1.5.2.4	Ciclos de la técnica de RCP	15
1.6	Descripción de las Razas Bovinas Holstein Friesian y Simmental	16
1.6.1	Holstein Friesian	16
1.6.2	Simmental	18
1.6.3	El Simmental en las Regiones Tropicales de México	19
1.7	Hipótesis	21
1.8	Justificación	21
1.9	Objetivos	22
2	MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1	Población Analizada	24
2.2	Aislamiento de ADN a partir de Sangre Completa	25

Capítulo	Página
2.2.1 Procedimiento del Aislamiento de ADN	25
2.3 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa de 8 y 5 Marcadores Tipo Microsatélites	27
2.3.1 Condiciones y Parámetros de los Programas de RCP	28
2.4 Electroforesis, Tinción e Identificación de Variantes	30
2.4.1 Técnica de Electroforesis	30
2.4.2 Resolución de los Fragmentos Amplificados	31
2.5 Análisis Estadístico	33
2.5.1 Número de Alelos	33
2.5.2 Determinación de la Heterocigosidad	34
2.5.3 Contenido de Información de Polimorfismo	34
3 RESULTADOS	35
3.1 Ganado Holstein Friesian	36
3.1.1 Número de alelos de 8 Marcadores	36
3.1.2 Frecuencias de Alelos de 8 Marcadores	37
3.1.3 Calculo de la Heterocigosidad	39
3.1.4 Determinación del Contenido de Información de Polimorfismo (PIC)	39
3.1.5 Análisis de la Probabilidad de Exclusión (PE)	40
3.2 Ganado Simmental	41
3.2.1 Numero de alelos de los 5 Marcadores	41
3.2.2 Frecuencias de Alelos de 5 Marcadores	42
3.2.3 Calculo de la Heterocigosidad	43
3.2.4 Determinación del Contenido de Información de Polimorfismo (PIC)	44
3.2.5 Análisis de la Probabilidad de Exclusión (PE) de los 5 Marcadores	45
4 DISCUSIÓN	47
4.1 Raza Holstein Friesian	47
4.2 Raza Simmental	49
5 CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53
APÉNDICE	57
Preparación de Soluciones y Reactivos	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Identificación Permanente	3
2	Identificación no Permanente	4
3	Secuencia Repetitiva de 15 Pares de Bases	9
4	Secuencia Repetitiva de 2 Pares de Bases	10
5	Reacción en Cadena de la Polimerasa	16
6	Raza Holstein Friesian	18
7	Raza Simmental	21
8	Verificación de Aislamiento de ADN	27
9	Verificación de Amplificación de SPS115, BM1824 y BM2113	32
10	Verificación de Amplificación de ETH10 y ETH225	32
11	Verificación de Amplificación de TGLA122 y TGLA227	33
12	Número de Alelos de los 8 Marcadores en la Raza Holstein	37
13	Grado de Heterocigosidad de los 8 Marcadores en la Raza Holstein Friesian	39
14	Determinación del Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) en la Raza Holstein Friesian	40
15	Probabilidad de Exclusión de 8 Microsatélites en la Raza Holstein Friesian	41
16	Número de alelos de los 5 microsatélite en la Raza Simmental	42
17	Grado de Heterocigosidad de los 5 Marcadores en la Raza Simmental	44

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>18</b>	<b>Determinación Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) de los 5 Marcadores en la Raza Simmental</b>	<b>45</b>
<b>19</b>	<b>Probabilidad de Exclusión (PE) de los 5 Marcadores en la Raza Simmental</b>	<b>46</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Características de los 9 Microsatélites por la Sociedad Internacional de Genética Animal (SIGA)	12
II	Características de la Raza Holstein Friesian	17
III	Peso vivo y Promedios zoométricos de la Raza Simmental	19
IV	Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiples	28
V	Mezclas de las Reacciones de Cadena de la Polimerasa Múltiples	29
VI	Etapas, Temperaturas y Tiempos de los RCP Múltiples	30
VII	Frecuencias de Alelos en la Raza Holstein Friesian	38
VIII	Frecuencias de Alelos en la Raza Simmental	43



## ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleosidos Trifosfato
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetracético
°C	Grados Centígrados
Ng	Nanogramo
μM	Micromolar
pb	Pares de Bases
RCP	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PE	Probabilidad de Exclusión
Pi	Frecuencia del Alelo i
PIC	Contenido de Información del Polimorfismo
Ph	Logaritmo Inverso de la Concentración de Iones de Hidrógeno
Rpm	Revoluciones por Minuto
SDS	Lauril Sulfato de Sodio
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>

## RESUMEN

José María Garza Lozano

Fecha de Graduación: Junio, 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Unidad de Biotecnología Animal

Título del Estudio: **DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GÉNICAS DE MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS BOVINAS HOLSTEIN FRIESIAN Y SIMMENTAL EN EL NORESTE DE MÉXICO**

Número de páginas: 61

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

Área de Estudio: **Biotecnología Animal**

**Propósito y Método de Estudio:** En la actualidad para la determinación del parentesco en los animales domésticos se sigue utilizando la tipificación sanguínea. Sin embargo este tipo de pruebas presentan un mayor grado de error en comparación a otros tipos de exámenes. En el presente estudio se formaron paneles de 8 y 5 marcadores de ADN tipo microsatélite con la finalidad de determinar su utilidad para la comprobación del parentesco en las razas Holstein Friesian y Simmental respectivamente. En la presente investigación se propusieron los siguiente objetivos:

i.-Establecer la metodología para el análisis de la genealogía en el ganado bovino de las razas Holstein Friesian y Simmental por medio de marcadores de ADN tipo microsatélites.

ii.-Determinar el número de alelos y la frecuencia génica de 8 y 5 microsatélites recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal en la población de las razas Holstein Friesian y Simmental del Noreste de México.

iii.-Estimar la heterocigosidad y el contenido de información de polimorfismo de cada uno de los marcadores.

iv.-Calcular la probabilidad de exclusión (PE) de cada marcador, así como la PE en forma combinada, con la finalidad de estimar su utilidad en análisis de la paternidad.

Dentro de los métodos utilizados, a las muestras de sangre completa se les aisló el ADN por medio de la técnica de desalado, para después verificar el aislamiento por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, y se visualizó en un trasluminador. Al ADN aislado se le realizó la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) múltiple. A los fragmentos amplificados se les realizó la técnica de electroforesis y fueron observados en un gel de agarosa al 2%. Los geles contenían un marcador de peso molecular para verificar el tamaño de los fragmentos por medio de transiluminación ultravioleta con bromuro de etidio, y estos fueron visualizados en el aparato fotodocumentador Fluor S Multi Imager empleando el programa computacional Multianalyst de Bio-Rad. La resolución de las pares de bases amplificadas se realizó por medio de electroforesis vertical en el secuenciador automático ABI PRISM 373 (Perkin Elmer), en el Laboratorio de Biopatología Veterinaria de la Universidad de Texas A&M. Con los datos que se obtuvieron se pudo determinar la frecuencia, heterocigosidad y polimorfismo de los marcadores más informativos del panel de que se analizó de las razas. En la Holstein Friesian fueron ETH225, TGLA227, BM2113, ETH10, BM1824, TGLA122 y en la Simmental fueron TGLA227, BM2113, SPS115 y ETH10. La PE total de los 8 microsatélites fue de 0.9988 en la raza Holstein Friesian y de los 5 microsatélites en la Raza Simmental fue de 0.9924

**Contribuciones y Conclusiones:** Los resultados permitieron identificar los microsatélites más informativos dentro de los paneles que se analizaron, lo cual nos da la seguridad para poder determinar el parentesco en estas razas. Con la Probabilidad de Exclusión (PE) obtenida en el presente estudio se concluye que con los marcadores genéticos analizados se puede identificar y verificar la paternidad de los animales en los registros de pedigrí en sustitución de la tipificación sanguínea.

FIRMA DEL ASESOR:



---