

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

Para la cría de cualquier especie animal se utilizan técnicas de reproducción. El objetivo en esta tarea es lograr que los ejemplares posean ciertas características consideradas necesarias para el mercado consumidor. Se comienza con la selección de los individuos que se acercan a las características ideales; son separados para cumplir la función de reproductores. De esta forma se asegura que las características que los distinguen pasen a la descendencia. A todo este proceso se le conoce con el nombre de selección artificial, porque se aparta de la selección natural. Generación tras generación, las crías tendrán más las características indicadas por las necesidades del mercado, alejándose de las características naturales de su raza.

El mejorar a los animales genéticamente es uno de los principales objetivos que se persiguen actualmente, esto con la finalidad de poder llegar a obtener más y de mejor calidad los beneficios que nos proporcionan los animales domésticos (carne, leche, etc.).

Entre las técnicas de reproducción que se están utilizando para la cría de los animales se encuentra la inseminación artificial y la del transplante de embriones; éstas han tenido un amplio progreso en las explotaciones de las diferentes especies ya sean bovinos, caprinos, ovinos y cerdos, permitiendo que el semental no este presente al momento del servicio, y por consiguiente, un solo macho podría llegar a tener cientos de hijos, y aún después de muerto seguir

teniendo descendientes. Por tal motivo la selección e identificación de los animales que nos van a servir como pie de cría deben de ser confiables y seguras, para que nos permita llevar a cabo buenos registros de pedigrí.

1.1 Registros de Pedigrí

El hombre primitivo era cazador y recolector. Subsistía con lo que la naturaleza tenía para ofrecerle. Participaba obligadamente de los ritmos naturales. Debía seguir las migraciones climáticas de los animales que se alejaban de las zonas frías en invierno y volvía a ellas en el verano. El hombre primitivo seguía a su comida en busca de pastos tiernos. El vínculo migratorio con su comida era, a su vez, el principal sostén de sus costumbres. Acostumbrado a las largas travesías, era un hombre de costumbres nómadas, no tenía una vivienda fija. Vivía en cuevas que había descubierto a lo largo del camino que recorría la manada (Legates y Warwick, 1992).

Este proceso migratorio detrás del alimento empezó a revertirse cuando el hombre aprendió a domesticar a los animales. Probablemente, el primer animal que el hombre logró domesticar fue el cachorro de lobo. Estos lobos domesticados fueron los antecesores del perro moderno. El perro primitivo lo ayudaba en las cacerías y seguía con él las migraciones de la manada. Con el tiempo el hombre adaptó en los bovinos lo que había logrado con el lobo.

Desde esos primeros tiempos hasta la actualidad, los ganaderos continuaron desarrollando sus técnicas para el manejo de los animales, con la finalidad de ir mejorando a sus animales genéticamente (Legates y

Warwick,1992).

La identificación de los animales en los últimos años ha tenido bastantes problemas a medida que ha crecido el numero de animales en los hatos.

La identificación de los individuos se puede dividir en dos categorías:

La Identificación Permanente y la Identificación No Permanente

1.1.1 Identificación Permanente

La identificación permanente incluye tatuajes en las orejas y las ubres, bosquejos, fotografías, marcas (de ácido, cáusticas, con hierro caliente y por congelación) e implantes electrónicos (Figura 1).

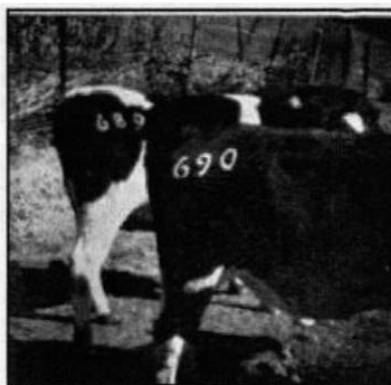


Figura 1 Identificación Permanente

1.1.2 Identificación No Permanente

Los tipos no permanentes de identificación son collares, aretes, bandas en las patas, etiquetas en el pecho o en el flanco.

El problema de los collares y bandas es que en cualquier momento podrían extraviarlos así como también al momento de querer identificar a un animal, es necesario estar cerca de éste.

La desventaja de los aretes, etiquetas en el pecho o en el flanco es que al momento de perforar la piel del animal es perjudicial para éste y se podría ocasionar una infección (Figura 2) (Bath, *et. al.*, 1986).

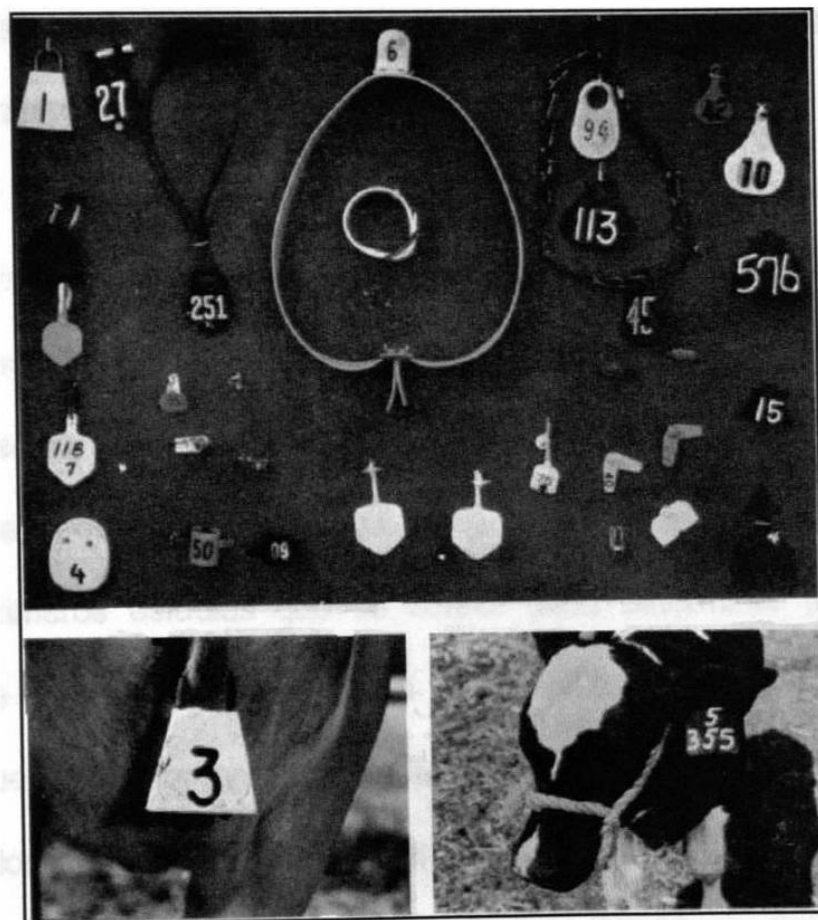


Figura 2 Identificación No Permanente

1.2 Técnicas de Laboratorio usadas para la identificación de los animales

1.2.1 Tipificación sanguínea

Los métodos que se utilizan para la identificación de los individuos que vamos a utilizar como pie de cría, tales como fenotipo, marcas, tatuajes, etc. son bastante subjetivos, y por lo tanto no son muy confiables para llevar un buen registro ni para identificar a los posibles sementales o vientres.

Debido a esto se empezó a utilizar la tipificación sanguínea como método de identificación y verificación de la genealogía de los animales; sin embargo esta técnica no presentaba el grado de confiabilidad que ahora se puede obtener con la genotipificación, que es del 99.999 %, en comparación con la tipificación sanguínea que es del 98.0 % (Caldwell, 1986).

Los primeros estudios que se usaron para determinar los caracteres genéticos fue en el hombre por medio de la tipificación sanguínea (Caldwell, 1986). Aunque todavía no se comprende, se especula que los carbohidratos de los glucolípidos de la membrana de los glóbulos rojos determinan si el grupo sanguíneo de un humano es A, B, AB, u O. La persona con tipo sanguíneo A presenta una enzima que contiene una N-acetilgalactosamina en el extremo de la cadena en tanto una persona con sangre tipo B tiene una enzima que une a la galactosa en la cadena terminal. Las personas con tipo AB poseen ambas enzimas y una que posea el tipo O no tiene ninguna de las enzimas (Karp, 1996).

Basándose en los estudios que se realizaron sobre la tipificación sanguínea en humanos esta se implementó en los animales con la cual se logra la diferenciación y el agrupamiento de los individuos, esto debido al polimorfismo que se encuentra en los tipos sanguíneos que vienen a ser la expresión de un genotipo específico (Caldwell, 1986).

El estudio de los tipos sanguíneos en bovinos se empezó a utilizar en el año de 1930, y consiste en identificar las diferentes variantes por medio de la tipificación sanguínea presentes en los glóbulos rojos por medio de técnicas serológicas (Caldwell, 1986).

De los 11 sistemas que se han logrado reconocer se van a encontrar más de 100 factores y estos por lo general desarrollan una variedad de combinaciones llamadas fenogrupos, de los cuales un individuo posee 2 fenogrupos de cada sistema, cada uno heredado de sus respectivos progenitores.

De los 30 cromosomas que presentan los bovinos, 11 de ellos van a presentar genes que van a codificar para tipos sanguíneos y por lo tanto se han registrado 11 sistemas independientes (Stormont, 1982).

1.2.2 Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Como en los estudios que se realizaron en la tipificación sanguínea se observó que entre mayor polimorfismo presenta un carácter se logra un mayor grado de variabilidad, se empezaron a buscar otras formas más específicas de reconocerla, tales como los marcadores genéticos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), también conocidos como Antígenos Linfocíticos

Bovinos (ALBo). Este tipo de pruebas se realiza por medio de reacciones inmunológicas; aunque con este tipo de exámenes es posible excluir a los animales que no tienen parentesco, no es posible determinar los que sí lo tienen (Caldwell, 1986).

Lo que se ha visto es que este tipo de pruebas son más prácticas con la finalidad de poder identificar a individuos que son resistentes a algunas enfermedades ya que este complejo está más relacionado con el mecanismo de la respuesta inmunitaria (Caldwell, 1986, Grosclaude *et al.*, 1981; Larsen, 1982; Oldenbroeck *et al.*, 1974).

En la 25a. Conferencia de la Sociedad de Genética Animal (SIGA) efectuada en Tours, Francia en 1996, se recomendó el uso de un panel de 9 marcadores de ADN del tipo microsatélites como estándar internacional para su evaluación y uso en el análisis de la genealogía en bovinos (Caldwell 1996).

1.3 Estructura del ADN

En el año de 1953, en laboratorios de los Estados Unidos y de Inglaterra se empezó a investigar la estructura del ADN. Los científicos James Watson y Francis Crick, en la Universidad de Cambridge, llegaron a la conclusión de que esta macromolécula presenta una forma de doble hélice. Basándose en los estudios que se realizaron se demostró que los genes estaban constituidos por ADN y que esta molécula venía a ser el material hereditario que se transmite de generación en generación y que también está constituido por ADN estructural no codificante; y es esta parte del ADN que viene a ser de utilidad para la

identificación de los animales mediante las pruebas de ADN (Karp, 1996).

Esta molécula está constituida por un azúcar desoxiribosa de cinco carbonos al cual se le une un fosfato esterificado en la posición 5' del anillo del azúcar y en el sitio 1' una base nitrogenada. Existen dos tipos de bases: las pirimidinas (Timina, Citosina) y las purinas (Adenina, Guanina) (Karp, 1996).

1.3.1 ADN Estructural no Codificante

Con los avances que ha habido en la genética molecular se han descubierto los primeros marcadores del ADN los cuales presentan alto grado de polimorfismo y por lo tanto se pudo desarrollar la técnica conocida con el nombre de huella digital multilocus y que consiste en explorar y localizar un número grande de loci en el genoma y la identificación de secuencias repetitivas en su estructura, llamadas ADN satélite (Amigues, *et. al.*, 1996; Aznar, *et. al.*, 1996; Bates, *et. al.*, 1996; Jeffreys., 1996).

1.3.2 ADN Satélite

Son secuencias que tienen alrededor de 5 a 100 pares de bases de longitud, repetidas gran número de veces para formar grupos muy extensos que logran albergar hasta 100 millones de pares de bases de ADN. Por ejemplo la mosca *Drosophyla vinilis* presenta 3 secuencias satélites diferentes cada 7 nucleótidos de largo, todas con secuencias similares, lo que indica un origen genético común (Karp, 1996).

1.3.3 ADN Minisatélite

Son pequeñas porciones del ADN que presentan en promedio alrededor 15 pares de bases de longitud y se pueden localizar en grupos de 1000 a 3000 repeticiones. Estas pequeñas porciones de ADN las podemos localizar en las regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas, como se observa en la figura 3.

ctcatcttaacgagg	ctcatcttaacgagg	ctcatcttaacgagg
------------------------	------------------------	------------------------

Figura 3 Secuencia repetitiva de 15 pares de bases

El problema de estos marcadores es que presentan un bajo grado de polimorfismo en comparación con otros tipos de marcadores (microsatélites); además no se encuentran distribuidas uniformemente en todo el genoma (Georges, *et. al.*, 1991).

1.3.4 ADN Microsatélite

Estos marcadores genéticos se diferencian de los minisatélites en que son más polimórficos y que se encuentran distribuidos en todo el genoma y por lo tanto, van a ser de mayor utilidad en el análisis de la genotipificación de los individuos. Asimismo se ve disminuido el grado de error en cuanto a la identificación de los animales (Georges, *et. al.*, 1991).

En comparación con otros marcadores genéticos, así como también con otras

técnicas de laboratorio, este nuevo análisis de los individuos con la finalidad de determinar la paternidad en los animales que se van a utilizar como pie de cría es de bastante importancia en los ranchos ganaderos (Ellis, 1986; Simpson, 1989;; Smith y Simpson, 1986).

Estas estructuras por lo general presentan un promedio aproximado de dos a cinco pares de bases de longitud y las podemos localizar en grupos de 100 o menos copias repetidas. Estas secuencias se encuentran en todo el genoma, como se observa en la figura 4 (Karp, 1996).

ct	ct	ct	ct	ct	ct	ct	ct	ct	Ct
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Figura 4 Secuencia repetitiva de dos pares de bases

Debido al alto grado de polimorfismo que presentan los microsatélites se ha empezado a utilizarlos con la finalidad de determinar la paternidad en los animales así como también en la investigación de enfermedades hereditarias (Gros, *et.al.*, 1981; Malo, *et.al.*, 1993; Stach, *et.al.*, 1984).

Este tipo de marcadores se van a diferenciar de los genes en que presentan un alto grado de polimorfismo, no codifican proteínas y por lo tanto no van a estar sujetos a la selección natural (Fries, *et.al.*, 1993, O'Brian, *et.al.*, 1993).

1.4 Microsatélites recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (SIGA)

En la 25ª conferencia de la SIGA realizada en Tours, Francia, se recomendó usar un grupo de 9 marcadores de ADN de tipo microsatélites como estándar internacional para su evaluación y uso en el examen de la genotipificación del ganado bovino (Tabla I) (Caldwell, 1996).

Como las técnicas de inseminación artificial y de transferencia de embriones se han difundido ampliamente y los progenitores no necesitan estar presentes para poder dejar su descendencia, es imprescindible el que se identifiquen correctamente a estos individuos. El que se implemente la técnica de la genotipificación en las diferentes explotaciones ganaderas para poder llevar buenos registros de pedigrí es muy importante, ya que se podrían cometer errores al momento de querer asignar la paternidad de algunos animales y esto podría repercutir en la composición genética de las poblaciones (Caldwell, 1986., Glowatzki-Mullis, *et.al.*, 1995).

En la tabla I se detallan las características de los 9 microsatélites recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (SIGA), tales como el tamaño del segmento amplificado, su ubicación cromosómica y la secuencia de los iniciadores de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) de cada uno de ellos (Caldwell, 1996).

Nombre del marcador	Tamaño (en pares de bases)	Número de 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: GCTGCCTTCTAC CAA ATA CCC I2: CTT CCT GAG AGA AGC AAC ACC
SPS115	240-262	15	I1: AAA GTG ACA CAA GAG 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 I1: ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G
ETH10	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: GCA ATT CCA AAT CTG TTA ATT TGC T I2: ACA GCA AGA AAC TCA ATG AAA GCA

Tabla I Características de los 9 Microsatélites Recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (SIGA).

La selección de estas secuencias de tipo microsatélites en la 25ª Conferencia de la SIGA fue basándose en las siguientes características.

- a. Localización en diferentes cromosomas
- b. Alto grado de polimorfismo
- c. Buena amplificación
- d. Posibilidad de ser amplificados por medio de RCP múltiple
- e. Los iniciadores de estos marcadores se pueden encontrar en forma pública así como también el protocolo de la RCP.

1.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)

La técnica de RCP fue desarrollada por Kary Mullis, en el año de 1983 y consiste en amplificar un pequeño fragmento de ADN mediante iniciadores específicos y la enzima polimerasa proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus*. La principal característica de esta célula procariótica, es que es estable a temperaturas de 90⁰ C ya que su hábitat es aguas termales. Por lo tanto la enzima polimerasa de esta bacteria es estable a las altas temperaturas y no se desnaturaliza como algunas otras (Watson, *et.al.*, 1992).

Con la creación de esta técnica (RCP) se puede realizar la amplificación de un pequeño fragmento de ADN a partir de muestras orgánicas como células reproductivas, sangre, saliva, pelo, etc. (Hohenhorst, *et.a.*,1994; Mullis y Faloona, 1987; Watson, *et.al.*,1992).

1.5.1 Procedimiento de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)

Es una técnica que permite duplicar un número ilimitado de veces un fragmento de ADN en un tubo de ensayo. Mediante esta técnica pueden generarse millones de moléculas idénticas, a partir de una molécula de ADN. Esto se puede conseguir en unas cuantas horas.

La reacción es muy sencilla, necesita cantidades de ADN muy pequeñas y sólo se precisa un tubo de ensayo, algunos reactivos, una fuente de calor y unas pequeñas cadena de nucleótidos que actúan como iniciadores.

1.5.2 Etapas de la Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)

- a. Desnaturalización del ADN a 94° C
- b. Hibridación de iniciadores
- c. Síntesis de ADN

1.5.2.1 Desnaturalización

La muestra de ADN se mezcla con los 4 desoxirribonucleótidos, la enzima polimerasa Cloruro de Magnesio (MgCl), Agua, Buffer y los 2 iniciadores que flanquean el fragmento de ADN que se desea amplificar (Watson, *et.al* ., 1992).

Estos iniciadores tienen la función de reconocer su contraparte de ADN para dar principio a la duplicación.

La molécula de ADN que va a copiarse se calienta a 92°-94° C para que se desnaturalice y se separe las dos hebras.

1.5.2.2 Hibridación de Iniciadores

En esta etapa la mezcla se enfría (entre 50 a 70 °C, dependiendo del segmento a amplificar) para que los iniciadores se unan a los extremos 3' de cada cadena del ADN en particular y a continuación la enzima agregue los nucleótidos a las extremos 3' de los iniciadores (Watson, *et.al.*, 1992).

1.5.2.3 Síntesis de ADN

Se eleva la temperatura a 72⁰ C, esto con el propósito de que se vuelva a activar la enzima para desarrollar la amplificación; a medida que la enzima alarga los iniciadores, copiando selectivamente al ADN específico, forma nuevas cadenas de ADN complementarias.

Las cadenas recién formadas son separadas de nuevo por el calor y comienza otro nuevo ciclo de copias. Estos ciclos se repiten hasta que se obtiene el número de copias deseado.

1.5.2.4 Ciclos de la Técnica de RCP

El número de ciclos va a depender de la concentración de linfocitos que contiene la sangre, como los bovinos presentan una cantidad de 10,000 células blancas por μL de sangre con 30 a 35 ciclos es suficiente. Por lo general se usan de 25-30 ciclos para 30,000 linfocitos, 30-35 para 15,000, 35-40 para 1000 y de 40-45 para 50 (Figura 5) (Anónimo, 2002).

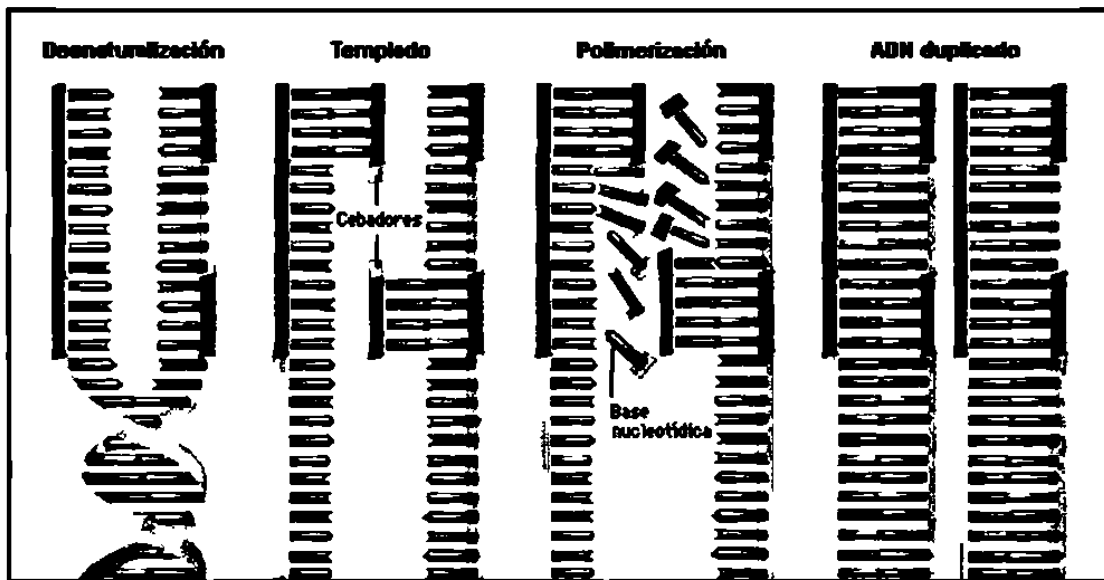


Figura 5 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) utiliza una enzima llamada Taq polimerasa para multiplicar rápidamente un pequeño fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN).

1.6 Descripción de las Razas Bovinas Holstein Friesian y Simmental

1.6.1 Holstein Friesian

El origen de la raza Holstein Friesian no se conoce con exactitud. Lo que se sabe es que en el siglo XVIII pequeñas manadas de animales de color blanco y negro fueron traídas al norte de Holanda con la finalidad de sustituir los animales que habían muerto víctimas de enfermedades e inundaciones. Y este ganado se cruzó con el ganado Holandés dando por consiguiente la raza Friesian Holandesa.

La raza Holstein Friesian, una de las razas lecheras más antiguas que existen, tuvo su origen en Holanda. Este tipo de ganado se cree que se ha explotado en esta región de Europa durante más de 2000 años.

Los datos que se han podido recabar señalan que la raza Holstein Friesian se introdujo por primera vez a los Estados Unidos en el año de 1621. Aunque algunos ejemplares importados en el año de 1861 fueron la base de los primeros animales que fueron registrados. Con los registros de estos animales se pudo establecer el libro Genealógico de la raza Holstein Friesian. Por otra parte en el año de 1867 se inició el libro Genealógico de la raza Friesian Holandesa. Posteriormente en el año de 1885 los dos grupos se unen formando lo que es ahora la Asociación Americana del Ganado Holstein Friesian (Reaves,1982).

Algunas de las características de la raza se presentan en la Tabla II (Reaves,1982)

Machos	815 a 997 Kg.
Hembras	589 a 679 Kg.
Crías al nacimiento	41 o más Kg.
Hocico	Bien formado y amplio
Ollares	Abiertos
Mandíbula	Fuerte
Frente	Ancha y acanalada

Tabla II Características de la Raza Holstein Friesian

El color particular de los ejemplares Holstein Friesian es negro y blanco.

Esta raza es la que produce mayor cantidad de leche en comparación con cualquier otra raza, con un porcentaje medio de grasa de 3.6 por ciento (Ensminger, 1981) (Figura 6).

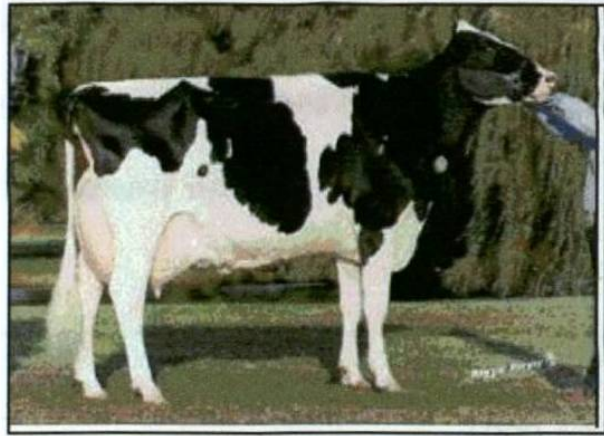


Figura 6 Ejemplar de la Raza Holstein Friesian

1.6.2 Simmental

Esta raza se originó en un valle del Simme Oberland bernés de Suiza, con un clima frío. Es considerada como de doble propósito de gran resistencia y adaptabilidad. En el siglo XVI la raza había sido cruzada con hatos alemanes, de donde surgió un animal parecido al Simmental que hoy conocemos, pigmentado en tonos café y blanco o café rojizo y blanco (Figura 7) (Cortés, 1999).

La capa del ganado Simmental es de color castaño amarillento o rojo, con manchas blancas. La cabeza, el vientre, el pecho y las patas y el cuerpo son blancos.

La cabeza es algo larga, morro amplio y no pigmentado, cuernos finos, de

color blanco. La espalda se funde con la cruz y el dorso es largo y derecho. La grupa, es larga, ancha y horizontal, el cuerpo es largo y los costillares están arqueados; las patas tienen huesos fuertes pero no muy largos; la ubre está bien implantada pero no muy grande (Figura 7).

El lomo y el muslo son musculosos, con extremidades robustas con cascos que se adaptan bien al trabajo.

El peso vivo y promedios zoométricos de Raza Simmental Adultos se muestran en la tabla III (Reaves, 1982).

	MACHOS	HEMBRAS
Peso vivo (Kg)	900-1200	550-750
Alzada a la Cruz (cm)	137-146	127-138
Perímetro torácico (cm)	220-250	195-215
Profundidad torácica (cm)	80-87	70-77

Tabla III Peso vivo y Promedios zoométricos de la Raza Simmental

1.6.3 EL Simmental en las Regiones Tropicales de México

En estas regiones, en donde prevalece el ganado *Bos indicus*, se han realizado desde hace tiempo cruzamientos con el ganado Simmental. Ello se debe a que el Cebú, conocido por su excelente resistencia al calor y la humedad, su rusticidad y tolerancia a los insectos, así como facilidad de parto y longevidad,

se complementan con las características del Simmental, como son la temprana madurez sexual, fertilidad, alta capacidad lechera, rápido crecimiento y calidad de la carne, lo anterior se traduce en beneficios para el ganadero (Cortés, 1999).

En los Estados Unidos de América, México, África y Asia, los cruzamientos de Simmental más comunes han sido con el Brahman para crear el Simbrah, y con el Nelore en Brasil, dando lugar al llamado Simbrasil. El Simmental puede ser usado tanto en la producción de F-1 como raza progenitora, como en una explotación cuya finalidad sea el sacrificio de los animales para abasto de carne. Los sementales de esta raza transmiten buena fertilidad y aumentan considerablemente el peso del ternero al nacer y su ganancia de peso diaria, al tiempo que no incrementan la mortalidad al parto. Este es el caso del cruce con el Cebú o con el ganado criollo, donde la totalidad de las crías se destinan al abasto. En el Brasil, hay muchos ejemplos de la productividad del F-1 Simmental/Nelore, cuyas crías alcanzan un peso de 530 kilos entre 20 a 24 meses en pastoreo, solo con sales minerales como complemento. Por el contrario con los sementales Nelore en las mismas condiciones, tardan de 44 a 48 meses para llegar a ese peso. El vigor o valor híbrido, es la mayor ventaja de los cruzamientos de individuos con características genéticas distintas. Al cruzar animales de razas diferentes, se obtiene una alta tasa de genes diferentes (heterocigotos) que proporciona una ganancia adicional mayor que la de los padres, lo que es la llamada heterosis. Esta heterosis nos da como resultado, un animal de muy buena fertilidad, precocidad, vitalidad y habilidad materna (Cortés, 1999).



Figura 7 Ejemplar de la Raza Simmental

1.7 Hipótesis

Con la utilización de los mejores microsatélites del panel de 9 que se utilizará para las razas Holstein Friesian y Simmental, se podrá implementar una prueba de verificación de la paternidad con un nivel de confianza aceptable de alrededor de 99%.

1.8 Justificación

Los registros de pedigrí requieren de seguridad en la identificación de los animales con la finalidad de utilizar un pío de cría confiable que se utilice en la generación de una población con características sobresalientes; por lo tanto es necesario implementar un sistema de identificación con un mínimo margen de error.

En la actualidad con la Genética Molecular aplicada en la identificación de animales se ha logrado utilizar marcadores de ADN (microsatélites) de manera confiable y segura.

Estos marcadores son exclusivos de cada individuo por lo que al conocer el genotipo se facilita su identificación y por lo tanto se podría determinar más fácilmente la relación de parentesco entre diferentes animales.

Por medio de esta investigación se pretende averiguar el número de variantes y frecuencias génicas de 8 microsatélites en las razas bovinas Holstein Friesian y Simmental pertenecientes a la población del Noreste de México, con la finalidad de establecer su utilidad para identificar individuos y posteriormente realizar pruebas de paternidad con un grado de confiabilidad del 99%.

1.9 Objetivos

En el presente trabajo se formuló el siguiente objetivo general:

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.

Dentro de este objetivo general se contempla los siguientes objetivos particulares.

- a. Establecer el número de alelos y la frecuencia génica de 8 microsatélites recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal en la

población de las razas Holstein Friesian y en la raza Simmental, del Noreste de México.

- b. Estimar el contenido de información de polimorfismo y heterocigosidad de cada uno de los marcadores.
- c. Establecer el calculo de la probabilidad de exclusión de cada marcador y en forma combinada, para fines de orientar su utilidad en análisis de paternidad que utilice los microsatélites que resulten de mayor significancia.

CAPITULO 2

MATERIALES y MÉTODOS

En esta Investigación se realizó el análisis del número y frecuencias génicas de las variantes alélicas de 8 de los 9 microsatélites que recomendó la Sociedad Internacional de Genética Animal (SIGA) (Caldwell, 1996); 8 en la raza Holstein Friesian y 5 de ellos en la raza Simmental en el Noreste de México

Con los datos obtenidos se logró determinar el valor de este tipo de marcadores para poder realizar el análisis de la genealogía en las dos razas de bovinos antes mencionadas. Para esto se calculo el número de alelos y su frecuencia génica, con lo cual se determinó el contenido de información de polimorfismo (PIC), la heterocigosidad y la probabilidad de exclusión de los microsatélites individuales, para determinar los mejores marcadores en cada grupo.

2.1 Población Analizada

Para la realización de este trabajo se aisló el ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de muestras de sangre que fue recolectada en tubo de ensayo que contenían anticoagulante (EDTA); de 39 animales de la raza Holstein Friesian y 38 de la raza Simmental.

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 Mederos en Monterrey, Nuevo León.

2.2 Aislamiento de ADN a partir de Sangre Completa

Para la obtención del ADN a partir de muestras de sangre se utilizó el método modificado de desalado de Heyen (Heyen, *et.al.*, 1997; De la Torre, 2001).

El material y equipo que se utilizó se enumera en el apéndice 1. El procedimiento para el aislamiento de ADN se menciona a continuación.

2.2.1 Procedimiento del Aislamiento de ADN

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

a. Lisis de eritrocitos

En un tubo eppendorf se añaden 750 μ l de buffer lisis eritrocitos y 750 μ l 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 μ l de buffer lisis, culminando esta fase al obtener una pequeña pastilla blanca en el fondo del tubo eppendorf.

b. Incubación de leucocitos

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

c. Precipitado de ADN

Al término de la incubación se agrega 50 μ l 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%.

d. Resuspensión en TE

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.

e. Almacenamiento

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

La verificación del ADN aislado se realizó mediante un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 0.8% a 70 volts durante 30 minutos, el cual

se puede observar en la figura 8; puede verse que en los carriles 2 y 6 existe poca concentración de ADN.

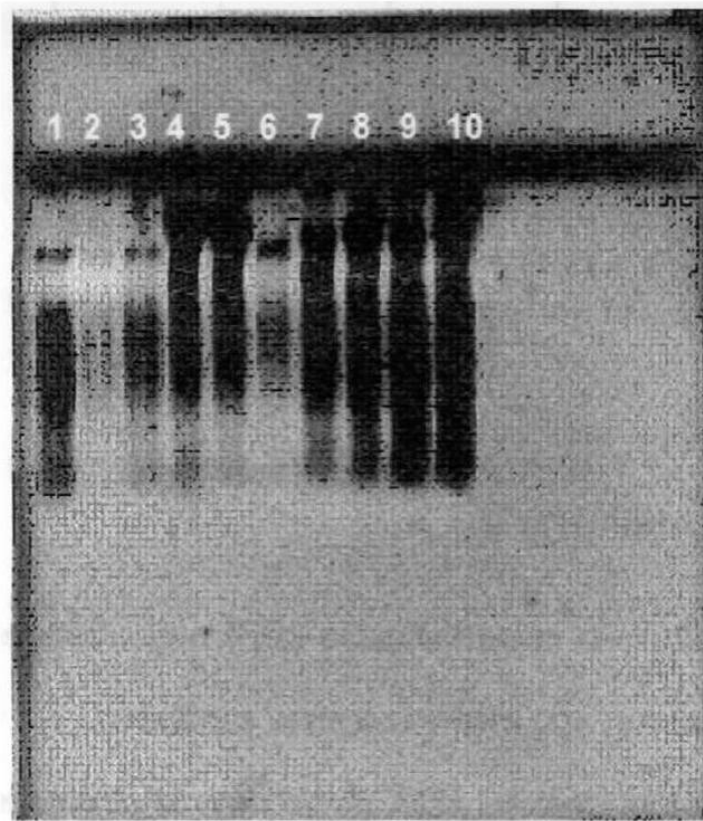


Figura 8 Verificación de Aislamiento de ADN en un gel de Agarosa al 0.8%.

2.3 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa de 8 y 5

Marcadores Tipo Microsatélites

En esta investigación se analizaron 8 loci de marcadores de tipo microsatélites en tres reacciones de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) múltiples con diferenciación por tamaño molecular de pares de bases, los cuales se clasificaron de la siguiente forma, de acuerdo a lo planteado por la SIGA (Tabla IV) (Caldwell 1996).

Múltiple 1	Múltiple 2	Múltiple 3
BM1824	ETH3	TGLA122
BM2113	ETH10	
SPS115	ETH225	TGLA227

Tabla IV Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiples

2.3.1 Condiciones y Parámetros de los Programas de RCP

Los experimentos efectuados en la estandarización de la técnica de RCP permitieron presentar las condiciones adecuadas para una óptima amplificación, siendo un factor determinante la cantidad de ADN utilizado, la concentración de iniciadores y la concentración del ion magnesio; los cuales determinaban la formación de productos de amplificación inespecíficos (exceso) o bien la deficiente amplificación (escaso), respectivamente. Confirmando de esta manera lo propuesto por Henegariu y cols. 1997.

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

En primer término se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de MgCl₂, de un mínimo de 1.0 mM hasta un máximo de 2.5 mM, utilizando 100 ng de ADN y condiciones estándares de amplificación.

La concentración de ADN que se utilizó fue la recomendada por

(Henegariu, *et.al.*, 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 iniciadores adecuada para cada reacción fue la disponibilidad de los stock's; fijándose la cantidad mínima requerida que proporcionara una definida amplificación.

Las mezclas finales de cada RCP conteniendo el ADN blanco, los iniciadores, el amortiguador con una concentración de 1.5 mM de MgCl₂, mezcla de Deoxidinnucleotidos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), la *Taq* polimerasa y el agua nanopura fué sometido a diversos programas en el termociclador los cuales están diferenciados por la temperatura de emparejamiento como condicionante principal (Tabla V).

Mezcla	Oligonucleótidos	d'NTP's	Buffer	Mg+	Taq	Agua	ADN
BM's	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

Tabla V Mezclas de las Reacciones de Cadena de la Polimerasa Múltiples

La reacción se llevó a cabo en un termociclador automático M. J. Research con tapa térmica, estandarizando las concentraciones de los elementos de cada reacción (Tabla VI).

Etapas	Temperatura	Tiempo
1. Activación de <i>Taq pol</i>	94°C	4 min.
2. Desnaturalización	94°C	1 min.
3. Emparejamiento	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.

Tabla VI Etapas, Temperaturas y Tiempos de los RCP Múltiples

* En el múltiple 2 se realizó un RCP doble ETH 10 y 225 a 60°C y un RCP 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.

2.4 Electroforesis, Tinción e Identificación de Variantes

2.4.1 Técnica de Electroforesis

Considerando la carga eléctrica negativa que posee la molécula de ADN dada por 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 indicador de corrimiento (jugo azul) fue de 4.5 cm por hora a 75 volts. El equipo y material de laboratorio utilizados se mencionan en el apéndice 1.

Al concluir el corrimiento electroforético de 75 V por 1h de los productos de ADN amplificados por la RCP se procede a teñir el gel por inmersión en una solución con Bromuro de Etidio (BE) al 0.1% en agua bidestilada (20 µl de 10 mg/ml.). Los productos de RCP amplificados son 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. Se verificó la amplificación en gel de agarosa al 2% en buffer TBE al 1 X.

2.4.2 Resolución de los Fragmentos Amplificados

Los productos de RCP se visualizan y documentan en el secuenciador ABI Prism 373A de Perkin Elmer y su tamaño se determina con relación a un marcador de peso molecular interno (Heyen, *et.al.*, 1997; Bates, *et.al.*, 1996; ; Ziegle *et.al.*, 1992). Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Biopatología Veterinaria de la Universidad de Texas A&M (Figuras 9, 10 y 11).

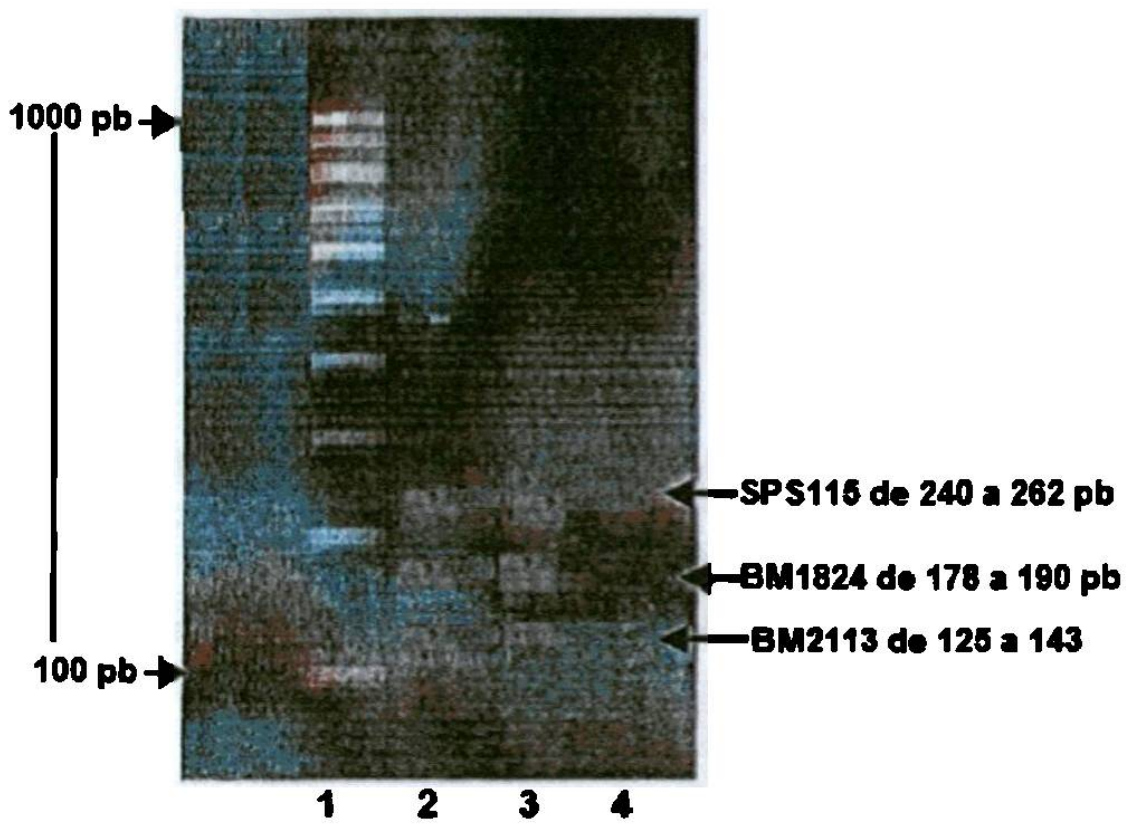


Figura 9 Verificación de Amplificación de los Marcadores SPS115, BM1824 y BM2113. En el carril 1 se encuentra el marcador Molecular y en los carriles 2 y 3 se observa la amplificación, el carril 4 es el control negativo.

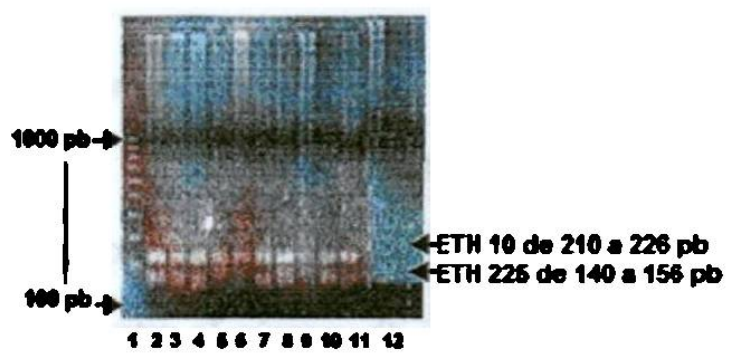


Figura 10 Verificación de Amplificación de los Marcadores ETH10 y ETH225. En el carril 1 se encuentra el marcador Molecular y en los carriles 2 al 11 se observa la amplificación, el carril 12 es el control negativo.

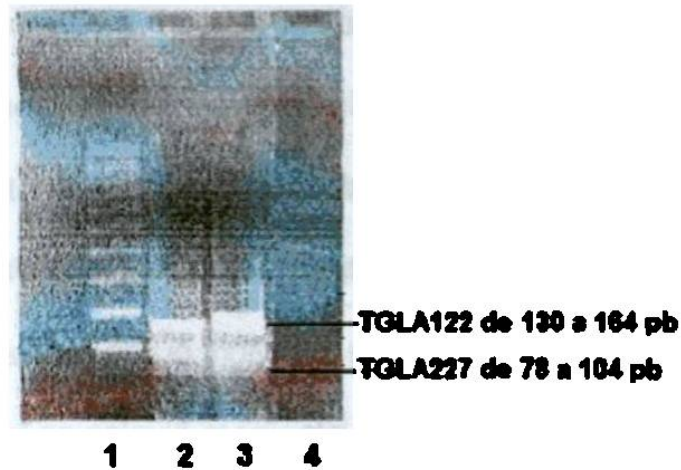


Figura 11 Verificación de Amplificación de los Marcadores TGLA122 y TGLA227. En el carril 1 se encuentra el marcador Molecular y en los carriles 2 y 3 se observa la amplificación, el carril 4 es el control negativo

2.5 Análisis Estadístico

2.5.1 Número de Alelos

Se determinó el número de alelos de cada microsatélite mediante conteo directo de cada una de las variantes. Las frecuencias génicas, dentro de cada microsatélite, se calculó mediante la división del número de veces que se presentaba cada alelo entre el número de veces que se presentaban todos los alelos.

2.5.2 Determinación de la Heterocigosidad

La heterocigosidad nos va a indicar el grado de polimorfismo que presenta cada par alélico, esto debido a que cada alelo proviene de cada uno de los progenitores, Esta inferencia origina un criterio de valoración en la proporción de material genético existente en un individuo por herencia de sus padres.

La heterocigosidad se calculó mediante la siguiente fórmula

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

donde:

P_i = es la frecuencia del alelo i

(Usha, *et.al.*, 1995; Heyen,*et.al.*, 1997)

2.5.3 Contenido de Información de Polimorfismo (PIC)

El Contenido de información de Polimorfismo (PIC) nos mostró el grado de variabilidad existente en cada uno de los marcadores genéticos investigados tanto en la raza Holstein Friesian como en la raza Simmental.

El valor de PIC se calculó por medio de 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, *et.al.*, 1995).

CAPITULO 3

RESULTADOS

La amplificación de los microsatélites BM1824, BM2113, SPS115, ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122 y TGLA227 se llevo a cabo realizando RCP múltiple en series de 10 muestras.

La verificación de los productos amplificados fue por medio de un gel de agarosa al 2% y buffer con TBE 1x; que contenía un marcador de peso molecular que servía de referencia para determinar el tamaño aproximado de los mismos. Los productos de RCP fueron enviados al laboratorio de Biopatología Veterinaria de la Universidad de Texas A&M para determinar exactamente el número de pares de bases de los microsatélites.

Es necesario aclarar que en la raza Simmental solo se presentan resultados de 5 marcadores genéticos, ya que aunque se realizó el trabajo de laboratorio para el análisis de los otros tres marcadores (BM1824, ETH3 y TGLA122) no fue posible obtener su genotipificación en el secuenciador de ADN, debido a problemas técnicos. Anteriormente se utilizó un sistema de detección del colorante fluorescente que incluía marcadores de peso molecular teñidos con un colorante diferente a los que tenían los productos de RCP, pero hacia el final de la investigación el laboratorio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Texas A&M cambio a un sistema de detección de la fluorescencia que incluía en los marcadores de peso molecular el mismo colorante que contenían los tres marcadores mencionados. Esto origino que la

señal fluorescente detectada por el rayo láser proveniente del marcador de peso molecular y de los tres marcadores genéticos se empalmara, originando resultados confusos para el programa de computo que determina el tamaño de los alelos, y obteniéndose resultados no confiables. Por lo anterior no se incluyeron dichos resultados en la presente investigación.

3.1 Ganado Holstein Friesian

3.1.1 Número de Alelos de 8 Marcadores

Los resultados conseguidos en la raza Holstein Friesian, en el número de alelos por marcador genético fue, en orden de mayor a menor, el siguiente: ETH3 19, ETH10 14, TGLA227 12, BM2113 10, ETH225 10, BM1824 9, SPS115 9 y TGLA122 9 (Figura 12).



Figura 12 Número de Alelos de los 8 Marcadores en la Raza Holstein Friesian.

3.1.2 Frecuencias de Alelos de 8 Marcadores

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, como se muestra en la Tabla VII. Pudo observarse que hubo una gran variabilidad en las frecuencias encontradas de los diversos alelos de la raza Holstein, ya que estas variaron desde 0.002 hasta 0.697. Los valores de frecuencia de alelos se utilizaron para el cálculo de la heterocigosidad.

BM1824			BM2113			SPS115			ETH3		
Alelo	N _o	Pi	Alelo	N _o	Pi	Alelo	N _o	Pi	Alelo	N _o	Pi
175	3	0.047	126	2	0.029	245	2	0.046	92	2	0.029
177	1	0.015	129	12	0.176	247	2	0.046	106	1	0.014
178	10	0.158	131	11	0.161	249	3	0.069	108	2	0.029
180	11	0.174	136	2	0.029	250	30	0.697	113	2	0.029
182	10	0.158	137	3	0.044	254	13	0.302	114	37	0.544
185	2	0.031	138	1	0.014	256	1	0.023	116	2	0.029
188	23	0.365	139	1	0.014	258	2	0.046	122	3	0.044
190	3	0.047	140	24	0.352	260	2	0.046	124	6	0.088
			142	7	0.102	262	1	0.002	125	1	0.014
			144	5	0.73				126	12	0.176
ETH10			ETH225			TGLA122			TGLA227		
Alelo	N _o	Pi	Alelo	N _o	Pi	Alelo	N _o	Pi	Alelo	N _o	Pi
105	1	0.013	114	1	0.014	128	1	0.020	66	1	0.021
178	1	0.013	116	1	0.014	141	3	0.060	76	2	0.042
183	1	0.013	134	1	0.014	142	21	0.420	80	3	0.063
197	1	0.013	136	1	0.014	147	2	0.040	82	6	0.127
199	1	0.013	140	2	0.029	148	10	0.200	86	1	0.021
204	1	0.013	142	16	0.235	150	2	0.040	87	1	0.021
217	8	0.111	148	1	0.014	159	4	0.080	88	3	0.063
217	8	0.111	150	17	0.25	161	6	0.120	90	11	0.234
221	15	0.208	152	21	0.411	162	1	0.020	92	1	0.021
222	1	0.013	154	7	0.109				94	2	0.042
223	27	0.375							96	14	0.297
225	2	0.027							102	3	0.063
227	3	0.41									
229	2	0.027									

Tabla VII Frecuencia de Alelos en la Raza Holstein Friesian

3.1.3 Cálculo de la Heterocigosidad

Como puede verse en la figura 13 el número todos los microsatélites excepto el SPS115 tuvieron valores altos de heterocigosidad. En orden descendente los microsatélites más heterocigotos fueron: BM2113, TGLA227, BM1824, ETH10, TGLA122, ETH225, ETH3 y SPS115. Los valores de heterocigosidad variaron de 0.83 hasta 0.4.

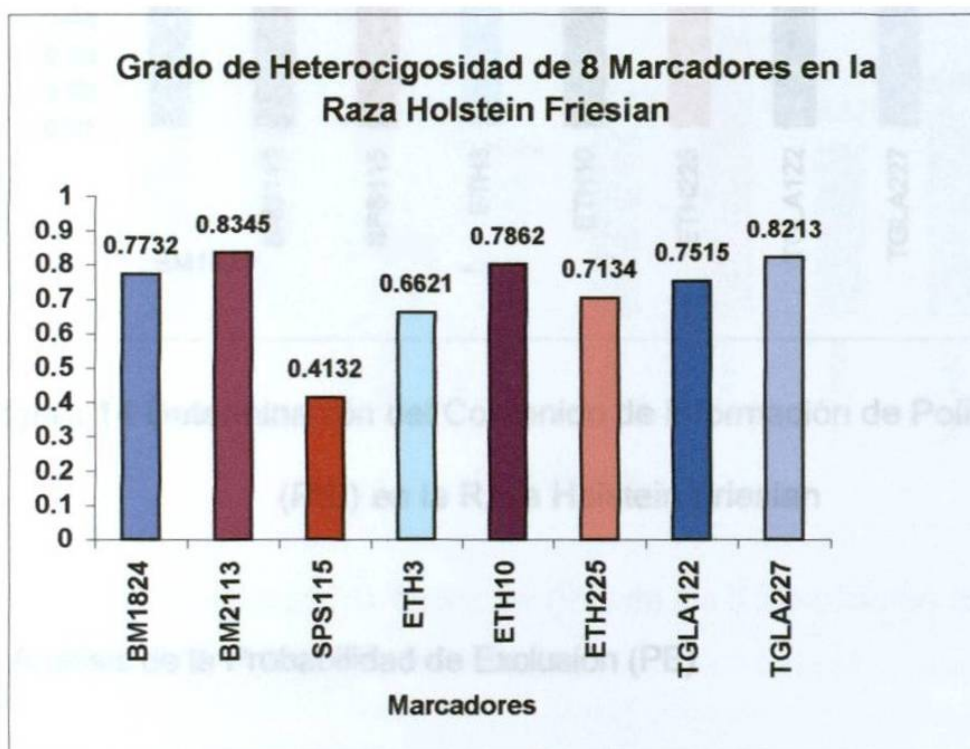


Figura 13 Grado de Heterocigosidad de 8 Marcadores en la Raza Holstein Friesian.

3.1.4 Determinación del Contenido de Información de Polimorfismo (PIC)

Como se puede observar en la figura 14, los 8 marcadores analizados

presentaron un alto Contenido de Información de Polimorfismo, excepto el SPS115. Los restantes marcadores tuvieron valores de PIC que variaron de 0.9925 a 0.9996.

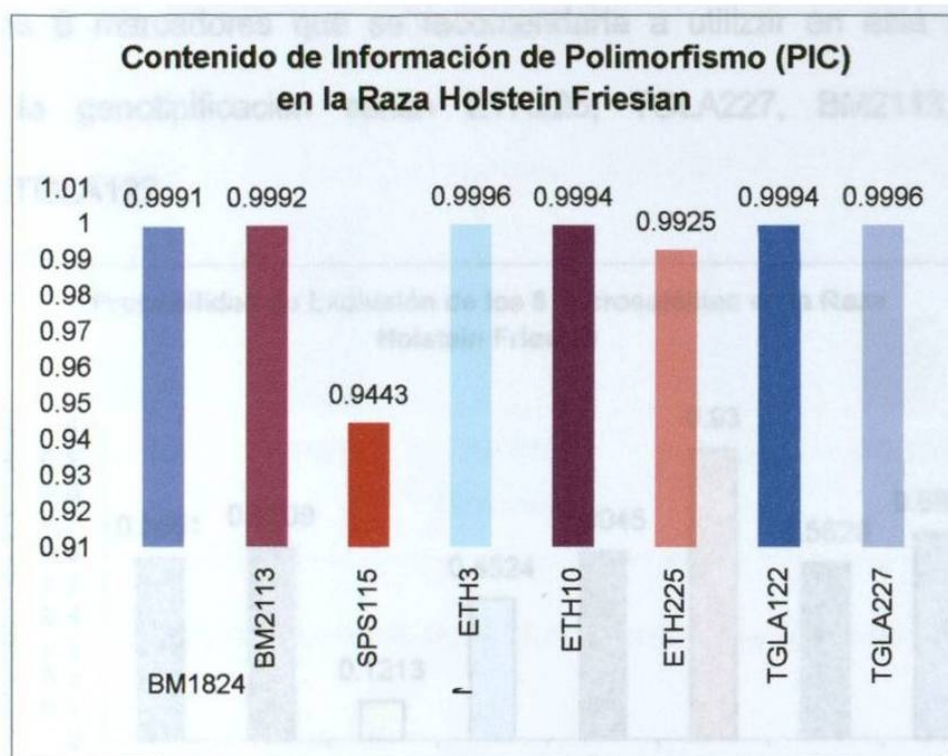


Figura 14 Determinación del Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) en la Raza Holstein Friesian

3.1.5 Análisis de la Probabilidad de Exclusión (PE)

Al igual que en el cálculo de la heterocigosidad, todos los microsatélites, excepto el SPS115, tuvieron valores alto de PE. Estos variaron de 0.1213 (SPS115) hasta 0.93 (ETH225). La probabilidad de exclusión de los microsatélites SPS115 y ETH3 indican que son muy poco informativos por lo que se recomienda su reemplazo en la raza Holstein Friesian. En orden descendente, los microsatélites con mayor PE fueron: ETH225, TGLA227,

BM2113, ETH10, BM1824,TGLA122, ETH3 y SPS115 (Figura 15). La PE total de los 8 microsatélites fue de 0.9988

Los 6 marcadores que se recomendaría a utilizar en esta raza para realizar la genotipificación serían ETH225, TGLA227, BM2113, ETH10, BM1824,TGLA122.

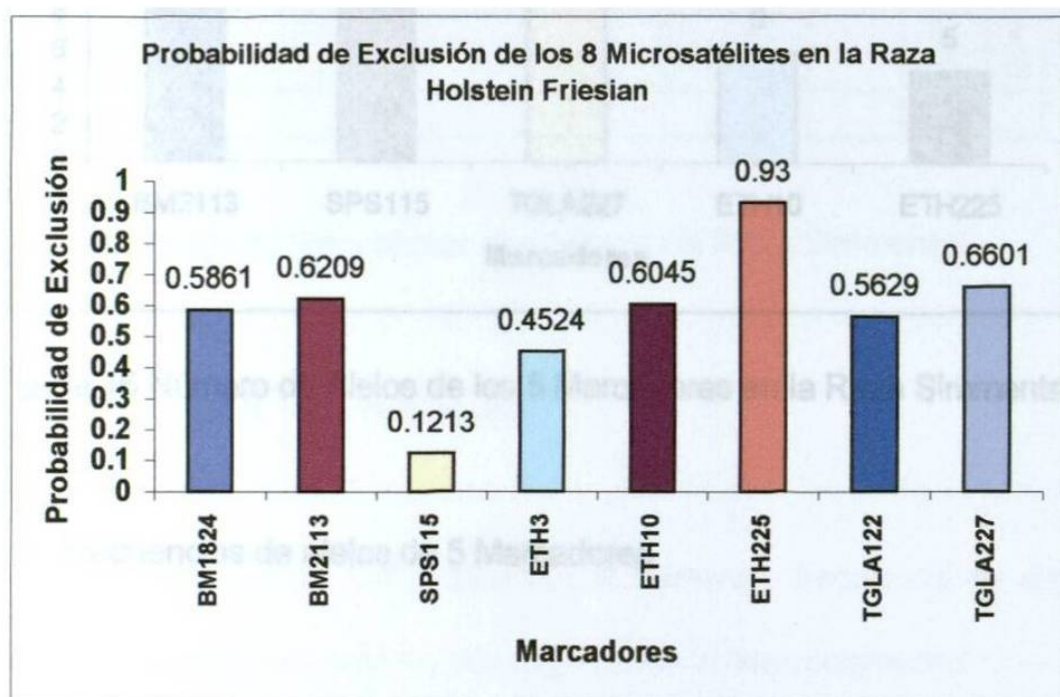


Figura 15 Probabilidad de Exclusión (PE) de los 8 Marcadores en la raza Holstein Friesian

3.2 Ganado Simmental

3.2.1 Número de Alelos de los 5 Marcadores

Los resultados conseguidos en la raza Simmental en el número de alelos por marcador genético fue, en orden de mayor a menor, el siguiente: BM2113

14 SPS115, TGLA227 13, ETH10 6, ETH225 5 (Figura 16).

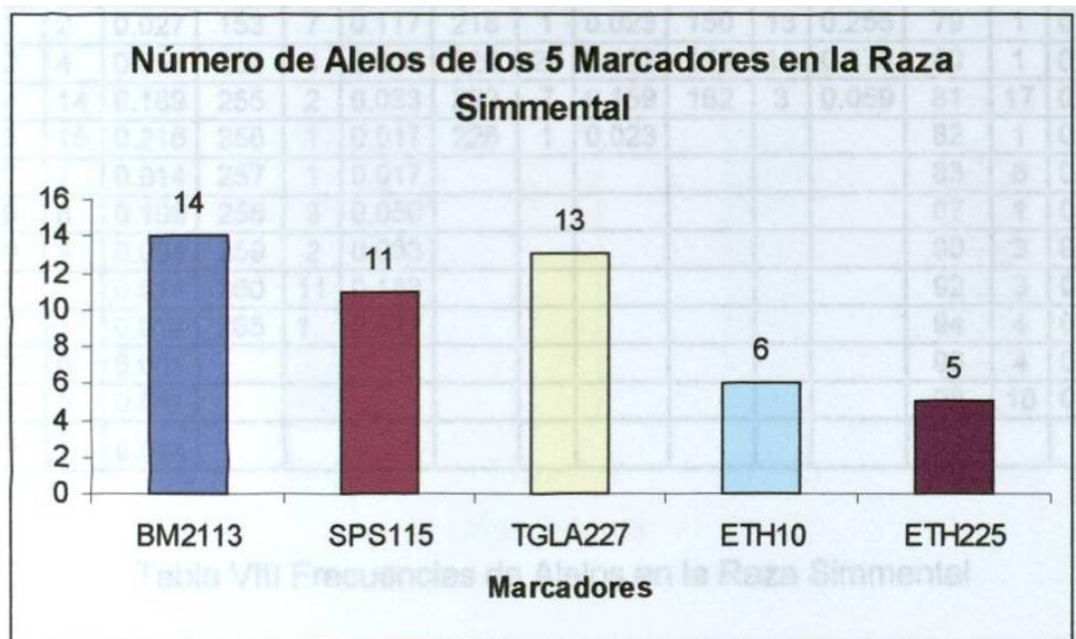


Figura 16 Número de Alelos de los 5 Marcadores en la Raza Simmental.

3.2.2 Frecuencias de alelos de 5 Marcadores

Las Frecuencias de los 5 Marcadores de la Raza Simmental se muestran en la Tabla VII. Al igual que en la raza Holstein Friesian, pudo observarse que hubo una gran variabilidad en las frecuencias encontradas de los diversos alelos ya que estas variaron desde 0.017 hasta 0.422. Los valores de frecuencia de alelos se utilizaron para el calculo de la heterocigosidad.

BM2113			SPS115			ETH10			ETH225			TGLA227		
Alelo	N _o	Pi	Alelo	N _o	Pi	Alelo	N _o	Pi	Alelo	N _o	Pi	Alelo	N _o	Pi
129	8	0.108	250	6	0.1	214	3	0.005	142	15	0.294	76	4	0.071
130	5	0.068	252	22	0.367	216	5	0.114	148	1	0.020	77	1	0.018
131	2	0.027	153	7	0.117	218	1	0.023	150	13	0.255	79	1	0.018
132	4	0.054	254	4	0.067	220	27	0.422	152	19	0.373	80	1	0.018
134	14	0.189	255	2	0.033	222	7	0.159	162	3	0.059	81	17	0.059
135	16	0.216	256	1	0.017	226	1	0.023				82	1	0.018
137	1	0.014	257	1	0.017							83	6	0.107
139	8	0.108	258	3	0.050							87	1	0.018
140	4	0.054	259	2	0.033							90	3	0.054
141	1	0.014	260	11	0.183							92	3	0.054
142	1	0.014	265	1	0.017							94	4	0.071
143	6	0.081										96	4	0.071
144	3	0.041										98	10	0.179
145	1	0.014												

Tabla VIII Frecuencias de Alelos en la Raza Simmental

3.2.3 Cálculo de la Heterocigosidad

Con la información obtenida sobre el número y frecuencia de alelos de los marcadores analizados se obtuvo el grado de la heterocigosidad.

Como puede verse en la Figura 17 todos los microsatélites excepto el ETH225 tuvieron valores altos de heterocigosidad. En orden descendente los microsatélites más heterocigosos fueron: TGLA227, BM2113, SPS115, ETH10 y ETH225, Los valores de heterocigosidad variaron de 0.9301 hasta 0.7059.

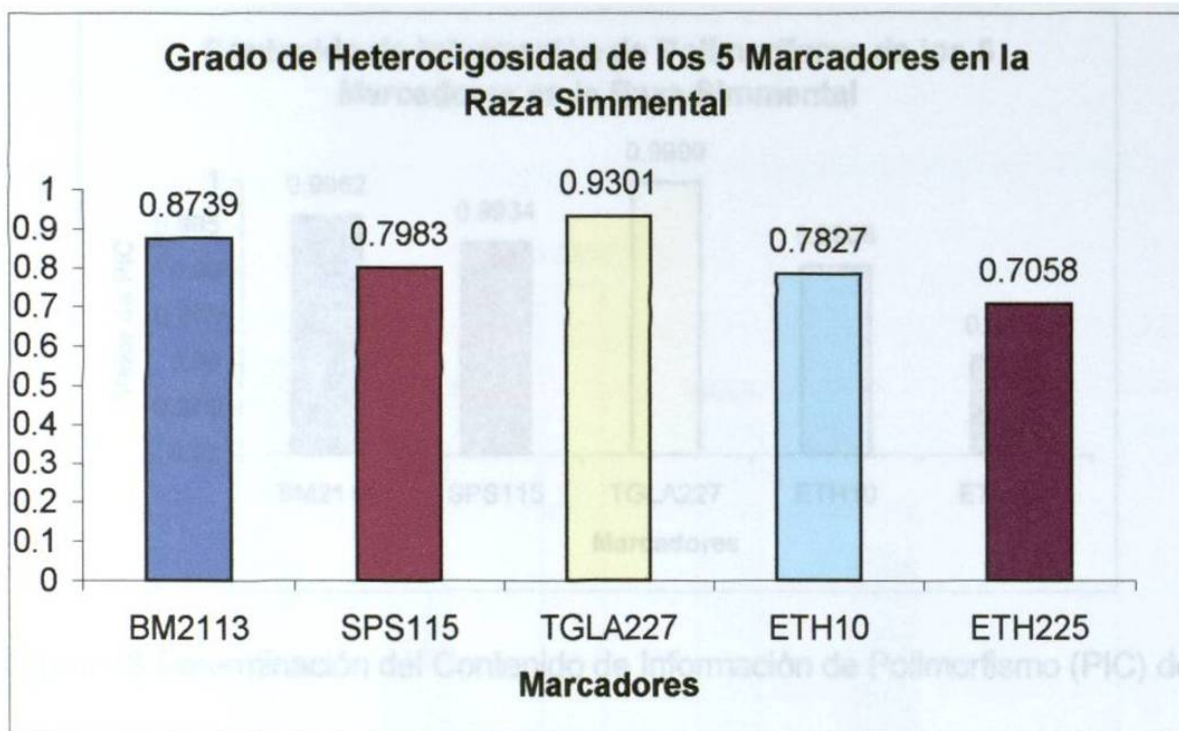


Figura 17 Grado de Heterocigosidad de los 5 Marcadores

3.2.4 Determinación del Contenido de Información de Polimorfismo (PIC).

En la figura 18 se muestran los valores de PIC para la raza Simmental. Puede observarse que estos variaron de 0.9999 a 0.9809. Los valores para 5 marcadores en orden descendente fueron: TGLA227, BM2113, SPS115, ETH10 y ETH225.

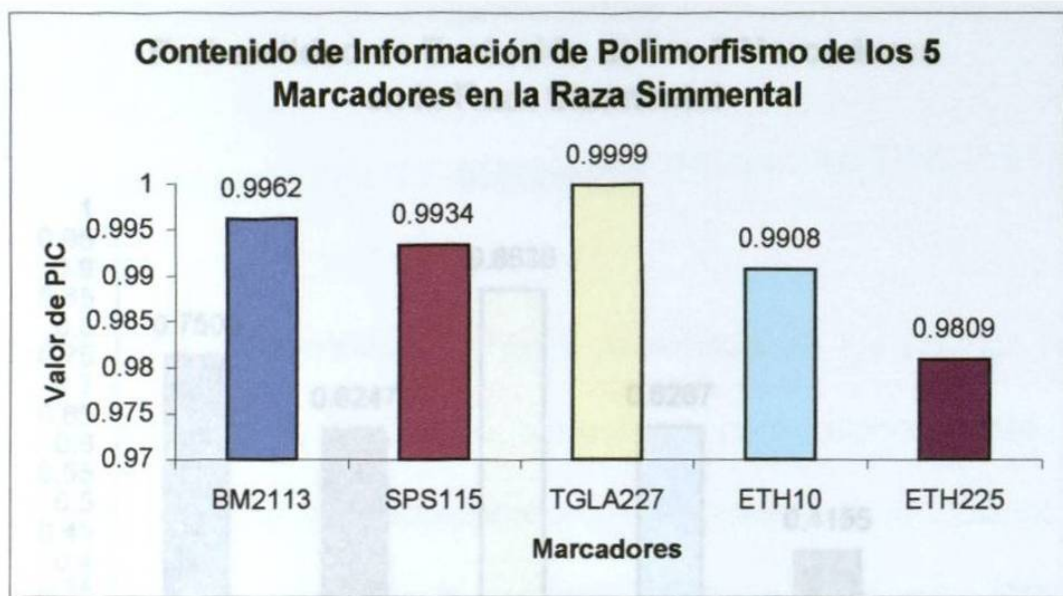


Figura 18 Determinación del Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) de los 5 Marcadores

3.2.5 Análisis de la Probabilidad de Exclusión (PE) de los 5 Marcadores

Como puede verse en la Figura 19, los microsatélites con mayor probabilidad de exclusión fueron el TGLA227 y BM2113, mientras que el tuvo la menor PE fue el ETH225. Los valores variaron de 0.8636 a 0.4155. La PE total de los 5 microsatélites fue de 0.9924

Con el uso de estos 5 marcadores se obtendrá un porcentaje de confiabilidad de un 99.24%, lo cual es suficiente para una prueba de paternidad adecuada.

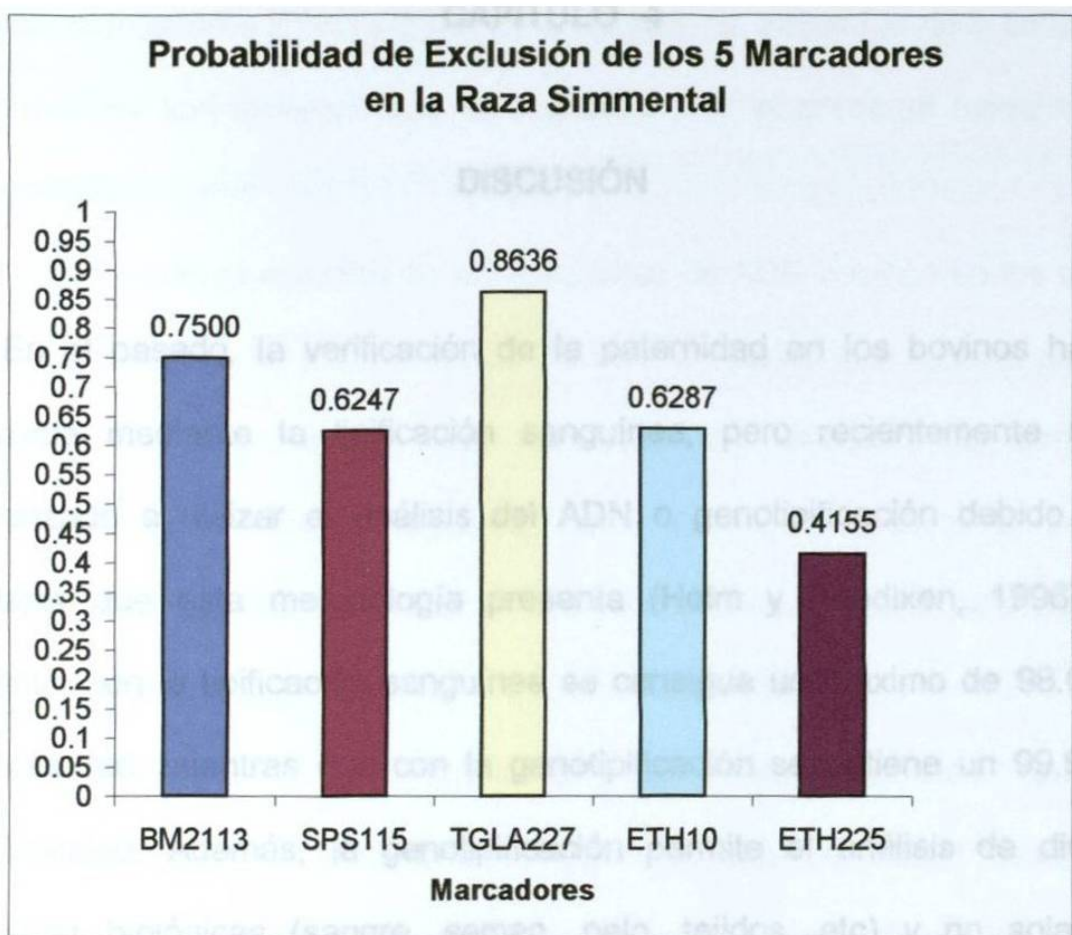


Figura 19 Probabilidad de Exclusión de los 5 marcadores en la raza Simmental

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

En el pasado, la verificación de la paternidad en los bovinos ha sido realizada mediante la tipificación sanguínea, pero recientemente se ha comenzado a utilizar el análisis del ADN o genotipificación debido a las ventajas que esta metodología presenta (Holm y Bendixen, 1996). Por ejemplo, con la tipificación sanguínea se consigue un máximo de 98.0% de confiabilidad, mientras que con la genotipificación se obtiene un 99.9% de confiabilidad. Además, la genotipificación permite el análisis de diversas muestras biológicas (sangre, semen, pelo, tejidos, etc) y no solamente sangre. Utilizando un estuche con once marcadores de ADN se obtuvo una confiabilidad de hasta 99.999% (Bates, *et.al.*, 1996; Usha, *et.al.*, 1995).

4.1 Raza Holstein Friesian

Estudios previos encontraron que respecto al número de alelos, los microsatélites TGLA122 y TGLA127 en la raza Holstein Friesian fue de 12 y 10 respectivamente, por lo que nuestros resultados son similares (Heyen, *et. al.*, 1997) En cuanto a los microsatélites ETH10, ETH3 y ETH225 se han reportado un número de alelos de 8, 7 y 8 respectivamente lo cual indica un número menor de alelos que nuestros resultados aunque las diferencias son pequeñas (Glowatzki-Mullis, *et.al.*, 1995). En otro estudio se encontró que

para los marcadores ETH3 y ETH225 el número de alelos fue de 5 en ambos; estos valores son menores que los reportados en el presente estudio (Ron, *et.al.*, 1995).

En los primeros estudios de microsatélites de ADN bovinos en los que no se especifica raza, se informó de un número de alelos que variaba desde 2 hasta 12, lo cual indicaba que no todos los microsatélites son muy polimórficos, por lo que es necesario, como se hizo en el presente estudio, determinar su número de alelos en las poblaciones de cada país (Steffen, *et.al.*, 1993; Ma, *et.al.*, 1996).

Respecto a la heterocigosidad, otros estudios han reportado heterocigosidades que van de 0.33 (microsatélites TGLA293) hasta 0.86 (microsatélites TGLA53). Estos valores se encuentran dentro del rango obtenido en el presente estudio (Heyen, *et. al.*, 1997; Usha, *et.al.*, 1995).

Respecto al contenido de Información de Polimorfismo, otras investigaciones realizadas en la raza Holstein Friesian han reportado valores de PIC que variaron de 0.62 (microsatélites ETH3) hasta 0.83 (microsatélites D2s9) y 0.70 (microsatélites ETH10). Estos valores están de acuerdo con lo encontrado en el presente estudio (Glowatzki-Mullis, *et. al.*, 1995).

Otros autores, utilizando microsatélites diferentes informan de valores de PIC de 0.18, 0.38, 0.27 e inclusive 0.07, lo cual indicaría que esos microsatélites no son muy informativos, mientras que los analizados en el presente estudio serian mejores para las pruebas de paternidad como lo ha mencionado Heyen *et.al* (1997).

En cuanto a la Probabilidad de Exclusión, en un estudio se informa de valores de PE que variaron de 0.421 a 0.696 para los microsatélites individuales y una PE total de 0.9920, lo cual esta de acuerdo con lo encontrado en el presente estudio (Glowatzki-Mullis, *et.al.*, 1995).

4.2 Raza Simmental

En un estudio publicado en 1997 se encontró que el número de alelos en la raza Simmental varió de 2 a 7 utilizando un panel de marcadores diferentes al presente; solamente el marcador TGLA227 se utilizó en ambos estudios y teniendo 5 alelos en el estudio mencionado. En el presente trabajo este marcador tuvo 13 alelos diferentes, además el marcador con el mayor número de alelos fue de 14, lo cual indica un mayor número de alelos en la población estudiada que en el informe mencionado (Heyen, *et.al.*, 1997).

En otros estudios en que no se especificaba la raza ya que fueron las primeras caracterizaciones de microsatélites, se informa de número de alelos que variaron de 2 a 8. Comparando estos valores con lo encontrado en este trabajo se observa que los marcadores estudiados tuvieron un mayor número de alelos.

En un estudio realizado utilizando otros marcadores genéticos las heterocigosidades variaron de 0.5 a 0.8 en la raza Simmental lo cual indica que con los marcadores utilizados en el presente trabajo se obtuvieron valores mayores de heterocigosidad (Heyen, *et.al.*, 1997; Usha, *et.al.*, 1995).

Estudios previos informan de un valor de PIC de 0.70 en la raza Simmental

utilizando algunos de los mismos marcadores del presente trabajo (Glowatzki-Mullis *et.al.*, 1995). Mientras que utilizando marcadores diferentes los valores de PIC encontrados variaron de 0.7 a 0.86 en la misma raza (Usha, *et.al.*, 1995). Comparado con nuestros resultados se observa que se obtienen valores de PIC mayores en la población analizada y con los marcadores utilizados en el presente estudio, lo cual indica que son recomendables para su utilización.

Se han encontrado Probabilidades de Exclusión que variaron de 0.42 a 0.63 en la raza Simmental utilizando tanto los mismos como otros marcadores; este dato concuerda en general con el encontrado en el presente estudio. En el mismo trabajo se informa de una PE total para la raza Simmental de 0.990, lo cual está muy cercano del valor encontrado en este análisis (Glowatzki-Mullis, *et.al* 1995).

Como comparación con las razas puras bovinas analizadas en este estudio, una investigación que incluyó los mismos marcadores de ADN en el Bisonte Americano informa que el número de alelos variaron de 3 a 9 (Mommens, *et.al.*, 1998); estos valores son un poco menores a lo encontrado en este trabajo y es posible que refleje el cuello de botella genético por el que pasaron las poblaciones de Bisonte en el siglo XIX. Respecto a la heterocigosidad, se informa que variaron de 0.13 a 0.83 (Mommens, *et.al.*, 1998). Estos valores son muy parecidos a los que se reportan en el presente estudio, aunque el marcador que tuvo la menor heterocigosidad presentó un valor mayor. En cuanto a los valores de PIC, en el Bisonte variaron de 0.12 a 0.80; como puede observarse estos valores son menores que los encontrados para ambas razas en el presente estudio, lo cual

confirma el gran valor de estos marcadores para las prueba de paternidad en las razas estudiadas (Mommens, *et.al.*, 1998).

CONCLUSIONES

En la presente investigación se logró estudiar la variabilidad de 8 y 5 microsatélites genéticos de las razas Holstein Friesian y Simmental, por lo cual se cumplió con los objetivos planteados que a continuación se describen:

- a. Se logró estandarizar en el laboratorio las condiciones y parámetros requeridos para poder realizar la genotipificación por medio de marcadores de tipo ADN microsatélites.
- b. Se consiguió determinar la frecuencia génica de 8 y 5 microsatélites, recomendados por la ISAG, en las razas Holstein Friesian y Simmental, en el noreste de México.
- c. Se calculó el Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) y la Heterocigosidad de cada uno de los 8 y 5 microsatélites por lo que se pudo conocer la variabilidad de cada uno de ellos, y se confirmó que se pueden utilizar para determinar la paternidad.
- d. Se consiguieron los valores de la Probabilidad de Exclusión individual y combinada, que ayudaría a definir el margen de error al utilizar la genotipificación para la asignación del parentesco.
- e. Con los datos que se obtuvieron se logró concluir que los microsatélites más informativos dentro del panel analizado fueron en la raza Holstein Friesian ETH225, TGLA227, BM2113, ETH10, BM1824, TGLA122 y en la raza Simmental TGLA227, BM2113, SPS115 y ETH10.

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.
- Anónimo, Microsoft ® Encarta ® Biblioteca de Consulta 2002. © 1993-2001 Microsoft Corporation.
- Aznar, M.P., Osta, R., Martín-Burriel, I., y Zaragoza, P. 1996. Evaluation of microsatellites for parentage identification in dogs. Animal Genetics 27 (supl. 2):28-29.
- Bates, S., Holm, T., Van, Haeringen, H., Lange, K., Ziegler, 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.
- Bath, D.L; Dickinson, F.N; Tucker, H.A; Appleman R.D 1986 segunda edición, Ganado Lechero, Principios, Practicas, Problemas Beneficios, pag 66-68. Edit. Interamericana, México
- 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>).
- Cortés Ramos, C. J. Origen del Simmental 1999.
cjortres@xal.megared.net.mx, ccortes@polbox.com
- De la Torre-Whitty, Laura A. 2001. Comparación de 5 Metodos de extracción de ADN a Partir de Sangre y Semen. Tesis de Licenciatura F.M.V.Z., U.A.N.L.
- Ellis, T.H.N. 1986. Restriction fragment length polymorphism markers in relation to quantitative characters. Theor. Appl. Genet. 72:1-2.
- Ensminger, M. E. Producción Bovina para Carne Pag. 47 Editorial el Ateneo 1981.
- 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.
- 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. and Bendixen, 1996. of microsatellites from the ISAG comparison test for parentage control in Danish Black-and-White cattle. Animal Genetics 27 (supl.2): 21
- Jeffreys, G. 1996. Families of Hypervariable Minisatellites. Animal Genetics, 16: 5-20.
- Karp, G. 1996. *Biología Celular y Molecular*, Edit. McGraw Hill. México.
- Larsen, B. 1982. On the bovine F blood groups system. An. Blood groups Biochem. Genet. 13(2):115.
- Legates, J. E, Warwick E. J, 1992 *Cría y Mejora del Ganado* Edit. Interamericana-McGraw Hill México Octava Edición México D.F: México. Pp.1-2.
- Ma, R Z., Rus I., Park C., Heyen, D W., Beever J E., Green C A., 1995 *Isolenetics* 27, 43 47 Isolation and characterization of 45 polymorphic microsatellites from the bovine genome. Animal Genetics 27: 43-47

- Malo, D.; Vidal S. M.; Hu, J.; Skamene, E.; y Gros, P. 1993. High-Resolution linkage map in the vicinity of the host resistance locus *bcg*. Genomics 16:655-663.
- 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 catalized 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.
- Reaves, P.M. y Pegram, C. W. 1982. El Ganado Lechero y las Industrias Lácteas en la Granja 5 Edición Editorial Limusa México.
- Ron M, Lewin H, Da Y, Band M, Yanai A, Blank Y, Feldmesser E, Séller J I 1995 Prediction of informativeness for microsatellite markers among progeny of sires used for detection of economic trait loci in dairy cattle Animal Genetics 26, 438-441
- 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.
- 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.
- 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

MATERIAL Y EQUIPO

Equipo de Laboratorio:

Para aislamiento de ADN se usó.

- a. Baño maría (60° a 65°C)
- b. Tubos eppendorf de 1.5 ml
- c. Micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 μ l
- d. Microcentrifuga
- e. Puntillas de Micropipetas de 10,100, 200 y 1000 μ l.
- f. Gradillas
- g. Papel Absorbente
- h. Vórtex
- i. Refrigerador
- j. Bascula Analítica
- k. Equipo de Electroforesis
- l. Congelador Revco
- m. Purificador de Agua Bidestilada
- n. Transluminador
- o. Equipo fotodocumentador Fluor S Multi Imager
- p. Programa computacional Multianalyst de Bio-Rad

Sugerencias:

Para que se obtengan buenos resultados en este tipo de investigaciones es recomendable seguir varias indicaciones como:

- a. Cualquier tipo de solución que se utilice debe ser esterilizada previamente a 121°C por 15 libras de presión.
- b. Utilizar guantes y cubre bocas para la preparación de soluciones, y para el aislamiento del ADN.
- c. Para evitar pérdidas de reactivos es recomendable utilizar la parte proporcional (alícuotas) de las soluciones, de lo que se va a utilizar.

Preparación de Soluciones y Reactivos**Buffer de Jugo Azul 6x:**

Se disuelve en 5 ml de agua ultra purificada (UPE) y 25 mg. de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 ml de glicerol y después aforar a 10 ml.

Buffer para la lisis de los Glóbulos Rojos:

En una solución de 7.75 ml de NH_4Cl al 1 M, se agrega 0.5 ml de NaHCO_3 al 1 M y 0.01 ml de EDTA al 0.5 M. mezclar y aforar con 50 ml de 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

José María Garza Lozano

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Énfasis en Producción Animal

Tesis: DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GÉNICAS DE MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS BOVINAS HOLSTEIN FRIESIAN Y SIMMENTALEN EL NORESTE DE MÉXICO

Campo de Estudio: Producción Animal

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey, N.L el 25 de Junio de 1959, hijo de José María Garza Abrego y María del Socorro Lozano Vera

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Grado obtenido Medico Veterinario Zootecnista en 1985.

Experiencia Profesional:

Institución: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Periodo 1985-a la fecha

Institución Maestro por horas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Secretario Administrativo.

Ponencias Presentación del trabajo en el Séptimo Congreso Latinoamericano de Estudiantes Egresados de Medicina Veterinaria, del 24 al 27 de octubre del 2001 realizado en Puerto Vallarta, Jalisco.



DONATIVO

