

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**DETERMINACION DEL NUMERO DE VARIANTES Y
FRECUENCIAS GENICAS DE 8 MICROSATELITES DE
ADN EN LAS RAZAS DE BOVINOS Beefmaster y Ganado
Suizo DE REGISTRO EN MEXICO**

**TRABAJO REALIZADO POR
DIANA COSETTE GALLARDO BLANCO**

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

JULIO, 2002

TM

SF197

.G3

e.1



1080117212

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



DETERMINACION DEL NUMERO DE VARIANTES Y
FRECUENCIAS GENICAS DE 8 MICROSATELITES DE
ADN EN LAS RAZAS DE BOVINOS *Beefmaster* y *Ganado*
Sable DE REGISTRO EN MEXICO

TRABAJO REALIZADO POR
DIANA COSETTE GALLARDO BLANCO

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

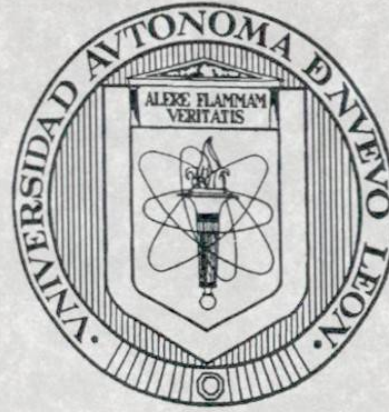
JULIO, 2002



IM
SF197
.63



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GÉNICAS DE 8
MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS DE BOVINOS Beefmaster
Y Ganado Suizo DE REGISTRO EN MÉXICO
TRABAJO REALIZADO POR

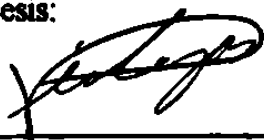
DIANA COSETTE GALLARDO BLANCO

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAestría EN CIENCIAS
VETERINARIAS con Especialidad en Genética Animal

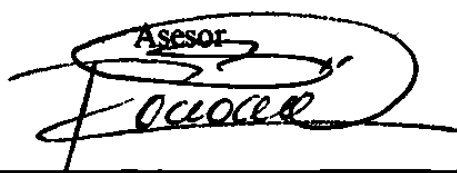
Julio, 2002

**DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GÉNICAS DE 8
MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS DE BOVINOS BEEFMASTER
Y GANADO SUIZO DE REGISTRO EN MÉXICO**

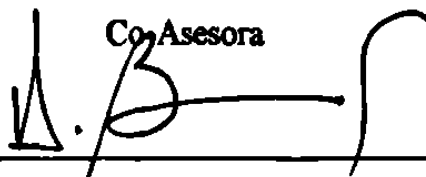
Aprobación por el Comité de Tesis:



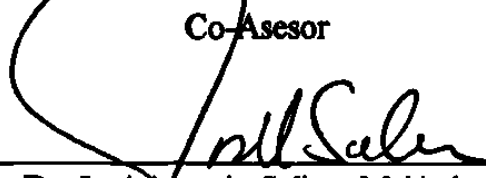
PhD. Victor Manuel Riojas Valdés



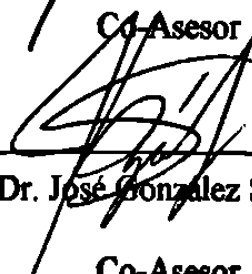
Dra. Rocío Ortiz López



PhD. Hugo A. Barrera Saldaña



Dr. José Antonio Salinas Meléndez



Dr. José González Salinas

Co-Asesor

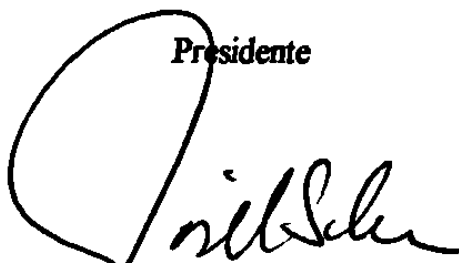
**DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GÉNICAS DE 8
MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS DE BOVINOS BEEFMASTER
Y GANADO SUIZO DE REGISTRO EN MÉXICO**

Aprobación por el Jurado de Tesis:



Dr. Víctor Manuel Riojas Valdés

Presidente



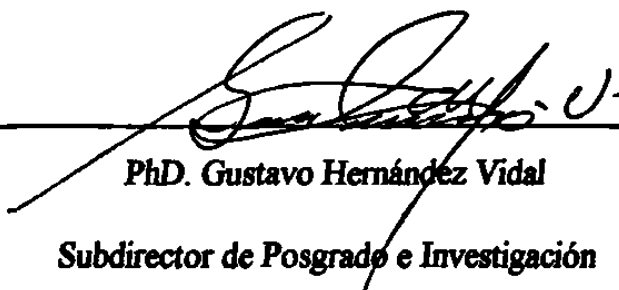
Dr. José Antonio Salinas Meléndez

Secretario



Dr. José González Salinas

Vocal



PhD. Gustavo Hernández Vidal

Subdirector de Posgrado e Investigación

El presente trabajo de tesis se realizó en las siguientes instituciones:

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia
Unidad de Biotecnología Animal, Monterrey, MÉXICO
Laboratorio del Dr. Víctor Riojas Valdés
vriojas@hotmail.com

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Departamento de Bioquímica,
Monterrey, MÉXICO
Laboratorio del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y Dra. Rocío Ortíz López
hbarrera@fm.uanl.mx y rortiz@ccr.dsi.uanl.mx

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencia Biológicas
Departamento de Microbiología e Inmunología, Monterrey, MÉXICO
Laboratorio de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y Dr. Roberto Montes de Oca
rmontesd@ccr.dsi.uanl.mx

Instituto Mexicano del Seguro Social
Centro de Investigaciones Biomédica del Noreste (CIBIN)
Departamento de Genética de Poblaciones, Monterrey, MÉXICO
Laboratorio del Dr. Ricardo M. Cerda Flores
ricardocerda@hotmail.com

Universidad de Texas A&M
Facultad de Medicina Veterinaria
Departamento de Patobiología, College Station, Texas, USA
Laboratorio del Dr. James Derr
jderr@cvm.tamu.edu

DEDICATORIA

DOY GRACIAS A DIOS, POR TENER JUNTO A MÍ

A MIS PADRES HUGO, ELVIRA Y MI HERMANO HUGO LEONID

AGRADECIMIENTOS

El apoyo económico fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología bajo el proyecto CONACYT -26502-B.

Agradezco a la vida que me ha dado la oportunidad de conocer excelentes personas, con quienes he convivido y de las que he aprendido a dirigir mis objetivos. A todos ellos les reitero mi agradecimiento con respeto y admiración, por creer en mi capacidad de desarrollar este trabajo de investigación, con sus sabios consejos e invaluable amistad:

José Antonio Salinas Meléndez, Ricardo M. Cerda Flores, Rocío Ortíz López, Hugo A. Barrera Saldaña, Roque Gonzalo Ramírez, Gustavo Hernández Vidal, Francisco Picón Rubio, Sergio Temblador Alcocer, Jorge Ramsy Kawas Garza, Héctor Fimbres Durazo, Luis Tolentino, Margarita Trujano, Gerardo Iglesias (†), Trinidad Beltrán y Arturo García (†).

Y un agradecimiento muy especial a todos mis *amigos y alumnos*.

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

**EL ENSUEÑO, EL SUEÑO Y EL ÉXTASIS SON LAS TRES
PUERTAS ABIERTAS AL MÁS ALLÁ, DE DONDE NOS VIENE LA
CIENCIA DEL ALMA Y EL ARTE DE LA ADIVINACIÓN. LA
EVOLUCIÓN ES LA LEY DE LA VIDA. EL NÚMERO ES LA LEY
DEL UNIVERSO. LA UNIDAD ES LA LEY DE DIOS.**

*Esencia de la doctrina de Pitágoras,
basada en las Inscripciones del
Templo de Delfos. Tomado del
libro Los Grandes Iniciados de
Eduardo Schuré.*

ÍNDICE GENERAL

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Antecedentes Generales	3
2.1.1 Antecedentes de la raza Beefmaster	3
2.1.2 Antecedentes del Ganado Suizo	4
2.2 Antecedentes Particulares	6
2.2.1 Importancia de la producción bovina	6
2.2.2 Identificación de individuos	7
2.2.3 Marcadores genéticos usados en la identificación de bovinos	8
2.2.4 Marcadores sanguíneos	8
2.2.5 Proteínas séricas	9
2.2.6 Marcadores de ADN	10
2.2.7 Marcadores genéticos de ADN	12
2.2.8 Tipos de polimorfismos en el ADN	13
2.2.8.1 ADN satélite	14
2.2.8.2 Minisatélites	14
2.2.8.3 Microsatélites	14
2.2.9 Huella dactilar de ADN	18
2.2.10 Ventajas de los microsatélites	18
2.2.11 Otros usos de los microsatélites	19
2.3 Análisis de la Genealogía	19
2.3.1 Técnicas de Biotecnología para análisis de paternidad	19
2.3.2 Análisis estadístico	21
2.4 Objetivos	25
2.4.1 Objetivo General	25
2.4.2 Objetivos Particulares	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Lugar de realización de la tesis	26
3.2 Reactivos	26
3.3 Equipo	27
3.4 Material	28
3.5 Origen de la muestra	29
3.6 Obtención de las muestras	29
3.7 Extracción de ADN	29
3.8 Protocolo para el análisis de los STRs	31
3.8.1 Preparación de los iniciadores	32

Capítulo	Página
3.8.2 Procedimiento para visualizar geles con el Fluor-STM Multimager	33
3.8.3 Condiciones para la PCR simple	34
3.8.4 Condiciones para la PCR múltiple	35
3.9 Método de electroforesis	37
3.9.1 Separación de alelos en poliacrilamida	37
3.9.2 Determinación de alelos en el ABI	39
3.10 Método estadístico	39
4. RESULTADOS	41
4.1 Resultados del muestreo	41
4.2 Evaluación de métodos de extracción de ADN	42
4.3 Resultado de la lectura de los iniciadores	45
4.4 Preparación de los iniciadores	46
4.4.1 Fluorescencia emitida	47
4.4.2 TGLA126 dañado	48
4.4.3 Amplificación individual de 8 STRs	49
4.4.4 Amplificación en mezcla de los iniciadores	50
4.5 Gel de poliacrilamida	53
4.6 Resultados en el secuenciador automático	54
4.7 Análisis de resultados	58
4.7.1 Número y frecuencia de alelos	58
4.7.2 Frecuencia genotípica	61
4.7.3 PIC y Heterocigocidad	64
4.7.4 Equilibrio de Hardy- Weinberg	65
4.7.5 Poder de discriminación y probabilidad de exclusión ...	65
5. DISCUSIÓN	68
6. CONCLUSIONES	72
7. LITERATURA CITADA	75

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Métodos de extracción de ADN	30
2	Características de los STRs	32
3	Condiciones para la PCR simple	34
4	Programa del Termociclador para cada STR individual	35
5	Agrupación de los STRs	35
6	Condiciones para la PCR múltiple	36
7	Programa en el termociclador para cada mezcla de iniciadores	37
8	Banco de ADN	41
9	Resultados con los diferentes métodos de extracción	42
10	Resultado de la lectura de los iniciadores en el espectrofotómetro	45
11	Concentraciones que resultaron al preparar las soluciones de trabajo	46
12A	Alelos que conforman el genotipo de los animales de la raza PS estudiados	56
12B	Alelos que conforman el genotipo de los animales de la raza BM estudiados	57
13A y B	Locus de cada MS, R (repeticiones) y pi (frecuencias), de cada alelo en la raza PS	59
14A y B	Locus de cada MS, R (repeticiones) y pi (frecuencias), de cada alelo en la raza BM	60
15A	Genotipos y frecuencia de los ocho STRs para el Ganado Suizo ..	62
15B	Genotipos y frecuencia de los ocho STRs para la raza Beefmaster	63
16	Contenido de Información Polimórfica (PIC), heterocigocidad (H) y cantidad de alelos de los STRs BM1824, BM2113, SPS115 y ETH3	64
17A	Pruebas de equilibrio HW, PE y PD, para los loci BM1824, BM2113, SPS115 y ETH3	66
17B	Pruebas de equilibrio HW, PE y PD, para los loci ETH10, ETH225, TGLA122 y TGLA227	67

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1	Ejemplo de cómo se da la combinación de alelos provenientes del padre y la madre presentes en el hijo 11
2	Distribución de la secuencia de un Minisatélite de 6 repeticiones en tándem (CTTTCT) 16
3	Distribución de la secuencia de un Microsatélite de tipo dinucleótido (TC) 16
4	Modelo del desarrollo para un loci de un microsatélite 17
5	Muestra de extracciones realizadas con 5 de los 7 diferentes métodos utilizados 43
6	Extracciones de ADN realizadas mediante el método DESALADO 44
7	PCR de los MSs BM2113 y BM1824. 47
8	Determinación en poliacrilamida de los iniciadores TGLA126R y TGLA126F. 48
9	Imagen de los 8 MSs amplificados por individual 49
10	PCR en múltiple de los MSs BM1824, BM2113 y SPS115 50
11	PCR múltiple de los MS ETH3, ETH10 y ETH225 51
12	PCR múltiple de los MSs TGLA 122 y 227 52
13	Apreciación de los alelos 180 y 188 del MS BM1824 53
14	Apreciación de los STRs fluorescentes por el ABI 55

NOMENCLATURA

A	Adenina
ABI	Secuenciador Automático
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BE	Bromuro de Etidio
BM	Beefmaster
C	Citosina
°C	Grados Centígrados
dNTP's	Mezcla de los cuatro Nucleótidos Trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiamino Tetracético
EUA	Estados Unidos de América
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
FSH	Hormona Folículo Estimulante
G	Guanina
H	Heterocigocidad
HCl	Ácido Clorhídrico
HW	Hardy- Weinberg
IA	Inseminación Artificial
IP	Índice de Paternidad
LRT	Prueba de Razón de la Verosimilitud
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
M	Molar
MAS	Marcadores de Selección Genética Asistida
MF	Marcador Fluorescente
Mg	Magnesio
mg	Miligramo
MHC	Complejo de Histocompatibilidad Mayor
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO ₃	Carbonato Ácido de Sodio
NH ₄ Cl	Cloruro de Amonio
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PD	Poder de Discriminación
PE	Probabilidad de Exclusión
pH	Potencial de iones Hidrógeno
pi	Frecuencia
PIC	Contenido de Información Polimorfica
PS	Ganado Suizo
QTL	Loci de Característica Cuantitativa
RFLP (s)	Fragmentos de Restricción de Longitudes Polimórficas (s)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
STR (s)	Repeticiones Cortas en Tándem (s) o Microsatélite (s)
T	Timina
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris- EDTA
TEA	Temperatura de Alineamiento del ADN
TM	Temperatura de Alineamiento
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UBA	Unidad de Biotecnología Animal
VNTR (s)	Repeticiones en Tándem de Número Variable (s) o minisatélite (s)

RESUMEN

Diana Cosette Gallardo Blanco
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Fecha de Graduación: Julio, 2002

Título del Estudio: DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GÉNICAS DE 8 MICROSATÉLITES DE ADN EN LAS RAZAS DE BOVINOS Beefmaster Y Ganado Suizo DE REGISTRO EN MÉXICO.

Número de páginas: 85

Candidata para el grado de Maestría
en Ciencias con especialidad en
Genética Animal

Area de Estudio: Biotecnología

Propósito y Método del Estudio: Las pruebas de paternidad con microsatélites, se usan para realizar los registros de una forma confiable, también para resolver disputas de paternidad o maternidad entre ranchos vecinos o en la venta de bovinos con linaje para pie de cría y en la comercialización segura de semen con valor genético para la inseminación artificial.

El objetivo de este estudio fue determinar el número de variantes y frecuencias génicas de ocho microsatélites para establecer una prueba de paternidad que no presente restricciones en cuanto al tipo de muestra biológica necesaria, ya que puede hacerse a partir de sangre, semen, pelo o saliva provenientes del animal en vida o incluso a partir del análisis post-mortem desde el matadero, o de la misma carne empaquetada en venta.

Se estandarizaron los métodos necesarios para la extracción de ADN a partir de sangre; para la amplificación de los ocho microsatélites por Reacción en Cadena de la Polimerasa y también la separación de alelos en gel desnaturizante de poliacrilamida. Los resultados obtenidos con esta metodología para las razas de bovinos Beefmaster y Ganado Suizo se les hizo un análisis estadístico de frecuencias alélicas y genotípicas.

Contribuciones y Conclusiones: Los ocho microsatélites analizados en este estudio; BM1824, BM2113, SPS115, ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122 y TGLA227, son altamente polimórficos lo cual aporta información suficiente para la identificación de bovinos aplicada en el análisis de paternidad.

Se analizó un total de 54 animales de Ganado Suizo y 59 de la raza Beefmaster para los ocho microsatélites; el BM1824 tuvo nueve alelos cada raza; el BM2113, 15 y 22; el SPS115, 11 y 14; ETH3, nueve y 11; ETH10, 13 y 14; ETH225, ocho cada raza; TGLA122, 12 y nueve; y el TGLA227, 14 y 13.

El resultado obtenido con el contenido de información polimórfica (PIC) en seis de los ocho microsatélites analizados fue de uno, para ambas razas que es lo más deseado en cuanto a información polimórfica se refiere, para los otros dos, el ETH3 y ETH225, fue de 0.99 ambos microsatélites en las dos razas.

La heterocigocidad (h) por microsatélite encontrado para cada raza fue de entre 0.6921 y 0.8397, para el Ganado Suizo y desde 0.5887 hasta 0.8811, para la Beefmaster.

El equilibrio de Hardy-Weinberg, fue variable pero se decidió no tomarse en cuenta para este estudio por el tamaño y origen de las muestras de ambas razas. En cuanto a la probabilidad de exclusión (PE), por microsatélite estuvo entre valores desde 0.5762 hasta 0.7966, para el Ganado Suizo, y desde 0.5570 hasta 0.9187, para Beefmaster.

Al realizar una PE combinada de los ocho microsatélites se obtuvieron valores de 0.9998 para el Ganado Suizo y de 0.9999 para la Beefmaster.

Los altos valores de h y PE corroboran la utilidad potencial de estos marcadores nucleares de ADN en la identificación genética de bovinos en México.



PhD. Víctor Riojas Valdés
ASESOR