

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La explotación de los bovinos como fuente abastecedora de alimento en todo el mundo, ha impulsado la generación de técnicas destinadas a mejorar las características productivas como la ganancia de peso y la producción láctea, principalmente.

La importancia de producir razas puras, se basa en obtener animales pie de cría que aporten las características deseadas; además introduce técnicas de campo como la inseminación artificial por medio de la cual se explota al máximo el aporte genético de un buen ejemplar. Esto mismo lleva a la elaboración de registros genealógicos (pedigrí), para controlar y asegurar la explotación comercial de un semental (Dogson *et al.*, 1997).

La confirmación de la paternidad de un reproductor se ha basado en varios factores, como lo es el parecido físico entre los supuestos padres y la cría, lo cual se puede prestar con mucha facilidad a la comercialización indiscriminada de animales para pié de cría o incluso para la venta de pajillas de semen. Afortunadamente, desde principios de este siglo los avances en la ciencia, específicamente en genética, han aportado nuevas herramientas para la identificación permanente y la comprobación de la paternidad (Bernal, 1997; Usha *et al.*, 1995).

El agrupamiento de animales por grupos sanguíneos con marcadores genéticos como los del Complejo de Histocompatibilidad Mayor (MHC, por sus siglas en inglés), los polimorfismos de proteínas del suero sanguíneo y últimamente el análisis de marcadores de ADN, se han estado utilizando para establecer la confirmación de la paternidad en bovinos (Bernal, 1997; Caldwell, 1986).

Estas técnicas basadas en la selección genética, tienen la ventaja de proporcionar datos precisos respaldados por métodos científicos que en la actualidad la mayoría requiere del análisis de ADN. Una ventaja muy importante de la técnica de marcadores de ADN es la obtención de muestras, ya que la extracción de ADN puede hacerse a partir no solo de sangre completa, sino que también de pelo, semen o muestras de tejido enviadas incluso desde el matadero

Los acelerados avances en la ciencia obligan a establecer nuevas técnicas que proporcionen herramientas seguras para la búsqueda de información en cualquier área de investigación. En verificación de la paternidad, la búsqueda de los microsatélites que nos serán útiles como marcadores genéticos es un paso para el establecimiento de pruebas de paternidad seguras y de interés económico para los criadores de ganado bovino de las razas Beefmaster y Ganado Suizo, aplicable en el establecimiento de los esquemas de cruzamiento.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes Generales

2.1.1 Antecedentes de la raza Beefmaster (Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Beefmaster, 2001)

La raza Beefmaster, originada en el sudeste de Texas en los años treinta y reconocida como raza pura en Estados Unidos desde 1954, se cría en México a partir de los años sesenta. La Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Beefmaster, fundada en 1982 con sede en Monterrey, ha expedido a la fecha más de 20 mil certificados, lo cual indica una gran difusión de esta raza en el país .

La base genética de ésta raza, proviene de las razas Brahaman (50%), Herford (25%) y Shorthorn (25%); la selección básica para lograr un alto grado de eficiencia en el Beefmaster se realizó en forma intensiva sobre sus seis características principales: disposición (docilidad), fertilidad, peso, conformación, vigor híbrido (rusticidad) y capacidad lechera. En cuanto a la disposición, el alto grado de precisión aplicado en la selección de este carácter ha dado como resultado un ganado de gran docilidad, rasgo hereditario y económicamente muy importante.

En fertilidad, los machos Beefmaster han sido seleccionados para entrar en servicio desde los 12 y medio a los 14 meses bajo el sistema de empadre múltiple para ser capaces de cargar todas las vacas bajo condiciones de libre pastoreo.

Así, la selección es continua ya que los menos capaces dejan menos material genético en la progenie. Las hembras por su parte están en condiciones de ser cargadas a partir de la misma edad que los machos y han demostrado que después de un periodo de empadre de 65 días en monta directa o inseminación, quedan preñadas un alto porcentaje de ellas. En la selección original, se desechan todas las hembras que no quedan cargadas luego del periodo de empadre.

La conformación se selecciona tomando en cuenta a los animales cuya canal reditúa la mayor cantidad de kilos de carne tierna y magra por kilo de peso en pie. Machos y hembras de esta raza presentan características ideales de conformación y la selección ha sido orientada para mejorar la zona comprendida entre los cuartos traseros y la faja del corazón, ya que se estima que cerca de 85% de la carne comercializada está en dicha zona, ignorando un tanto del cuarto delantero y la cabeza.

La característica de vigor híbrido en el Beefmaster se basa en aquellos individuos que requirieron menos cuidado y al mismo tiempo cumplieron con una alta producción. El vigor de la raza se traduce en un alto grado de adaptabilidad a los diferentes climas (desiertos, zonas tropicales, zonas frías, etc.) y resistencia a insectos y enfermedades, así como en una vida larga y productiva.

2.1.2 Antecedentes del Ganado Suizo (Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Suizo, 2001)

El Ganado Suizo, una de las razas europeas de mayor antigüedad, tuvo su origen hace aproximadamente un milenio en los altos valles de los Alpes suizos. Durante el último medio siglo, más de cuarenta países han empleado la raza Suiza para mejorar sus ganaderías.

Su importancia para México es indiscutible, ya que entre las razas provenientes del viejo continente, es la que más difusión ha tenido en el país y se le encuentra prácticamente en todos los estados de la República.

Su popularidad se comprueba con el hecho de que ocupa desde hace años el primer lugar en ejemplares participantes en las exposiciones locales, regionales y nacionales. Esta es una raza de doble propósito, ya que por un lado permite a los productores un remanente de leche que contribuye a solventar los gastos del rancho y por otro lado, ofrece excelentes resultados en su cruce con el ganado cebuino, cruce muy popular en vastas zonas de México.

Este ganado llegó a México desde el siglo pasado, pero es desde las últimas dos décadas que ha cobrado un desarrollo impresionante, al difundirse hacia todos los puntos de la geografía nacional.

El pie de cría para la formación del hato mexicano de Suizo provino tanto de su país natal como de Canadá, así como la variedad europea y de los Estados Unidos en la llamada variedad americana, especializada en la producción de leche. Desde hace muchos años no hay importaciones directas de Suiza, ya que cuando es necesario refrescar las sangres los criadores mexicanos y canadienses, han surtido de manera eficiente la demanda.

Se realizaron algunos intentos de hacer una sola variedad a partir de las variedades americana y europea, pero los resultados no fueron satisfactorios, así que los criadores decidieron especializarse en una u otra variedad, ya que las dos se adaptan con suficiente rusticidad al diverso campo mexicano; de tal forma que se puede encontrar ganado Suizo de las dos variedades, desde las regiones altas y frías del Altiplano hasta las inhóspitas del trópico húmedo.

Actualmente existen en México alrededor de 70 mil ejemplares puros de las dos variedades y la Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Suizo de Registro, que en 1993 cumplió 25 años de fundada, cuenta con más de 200 miembros activos en todo el país.

2.2 Antecedentes Particulares

2.2.1 Importancia de la producción bovina

Para este estudio se han seleccionado dos razas de la especie bovina, una de importancia lechera (Ganado Suizo) y la otra de importancia para producción de carne (Beefmaster). En la cría de ganado se busca mejorar las características productivas (ganancia de peso, color, rusticidad y producción láctea), lo que se consigue por medio de animales para pié de cría que se busca, deben tener un valioso aporte genético (desde el punto de vista fenotípico). El mejoramiento de éstas características se consigue por empadres controlados, por monta natural o IA. Una de las formas de llevar un control de los descendientes de estos ejemplares es la elaboración de registros los cuales, en países desarrollados como EUA se basan en marcadores genéticos para la identificación de individuos (Bernal, 1997).

En ganado bovino, las pruebas de paternidad son útiles para resolver todos los inconvenientes que se han presentado a lo largo de la comercialización de animales de razas puras y en la comercialización de semen para IA (Mommens *et al.*, 1998). Las pruebas de paternidad pueden utilizar varias herramientas como lo son la tipificación de grupos sanguíneos, polimorfismo de proteínas en el suero sanguíneo y últimamente la tipificación de ADN, que ha demostrado ser una poderosa herramienta para resolver correctamente la paternidad. Los usos de una prueba de paternidad en bovinos son los siguientes:

- Diagnóstico de Paternidad
- Diagnóstico de Maternidad
- Discriminación de Individuos

Todos estos usos son aplicados para la certeza del semen que se comercializa de un semental muy valioso; en la confusión de animales entre ranchos vecinos; en la subasta y exposición ganadera de ranchos con hatos de animales con pedigrí muy valioso.

2.2.2 Identificación de individuos

Existen varias formas para identificar a los animales integrantes de un hato dentro de una población de ganado bovino; como el empleo de tatuajes, aretes, collares y chips; cualquiera de estos se suma a una base de datos o registros, los cuales tienen que coincidir con la descripción del fenotipo (remolinos, manchas, marcas, color de capa, etcétera). De esta manera, el productor lleva el control de sus animales mediante registros que incluyen todos estos datos; en estos mismos se incluye información sobre sus ancestros y su descendencia, lo que contribuye al valor que llega a tomar un animal en función de la carga genética deseable que se toma como referencia de estos registros. Todo esto en conjunto se le conoce como el pedigrí de un animal (Ron *et al.*, 1993; Ron *et al.*, 1994).

La genealogía de los bovinos basada en antecedentes genealógicos no proporciona fiabilidad debido a la posible confusión e imprecisión de datos que proporciona solo el fenotipo y la información registrada sobre sus ancestros. De esta misma forma, la confirmación de la paternidad de un reproductor basada solo en el parecido físico entre los supuestos padres y la cría, se presta a la misma imprecisión y confusión de datos. Estos criterios tienen un importante margen de error, debido a que son subjetivos, ambiguos y escasamente informativos (Bernal, 1997).

2.2.3 Marcadores genéticos usados en la identificación de bovinos

Como se mencionó antes, dentro de la industria del ganado bovino se han utilizado diferentes tipos de marcadores genéticos para realizar pruebas de paternidad; estos marcadores sirven a su vez para agrupar y diferenciar animales, a continuación se describe su aplicación (Bernal, 1997; Caldwell, 1986; Committee on DNA forensic Science and Commission on DNA forensic Science. 1996; Mommens *et al.*, 1998).

2.2.4 Marcadores Sanguíneos

El término grupo sanguíneo o fenogrupa implica uno o más antígenos codificados por varios alelos que se encuentran en un mismo gen. Esto representó la primera forma en que los animales domésticos se agruparon y diferenciaron basándose en un criterio objetivo (Bernal, 1997).

La identificación de animales a partir del tipo sanguíneo, se basa en una combinación de antígenos de superficie de los glóbulos rojos, la cual no es igual en todos los individuos. Esta combinación es detectada por medio de una reacción complementaria con anticuerpos. En los bovinos los tipos sanguíneos son divididos en 10 sistemas, cada grupo sanguíneo comprende una serie de antígenos controlados por los alelos en su locus particular del cromosoma. Estos grupos sanguíneos se conocen como A, B, C, F, J, L, M, S, Z y R; lo que significa 10 diferentes pares de cromosomas involucrados (Caldwell, 1986).

La diversidad de formas existentes o polimorfismo de los antígenos de glóbulos rojos (grupos sanguíneos) y de los antígenos de glóbulos blancos codificados por los genes del complejo de histocompatibilidad mayor, es una característica importante para la identificación de un individuo; lo que significa que entre más variantes distintas tenga un carácter utilizado como marcador genético, mayor es su utilidad en la identificación de un animal dentro de una misma especie (Bernal, 1997; Caldwell, 1986).

2.2.5. Proteínas Séricas

Existen metodologías de identificación genética más objetivas; estas técnicas se basan en el análisis de la información genética contenida en el ADN o en sus productos (proteínas). Los métodos avanzados con que se cuenta actualmente permiten identificar características genéticas heredables, lo que proporciona una herramienta útil en la identificación certera del parentesco por pruebas de paternidad que se basan en las frecuencias de alelos, las cuales son características de cada raza (Vankan *et al.*, 1999).

Este método a diferencia del de los grupos sanguíneos, se encarga de determinar polimorfismos (variantes) de proteínas tales como la albúmina, transferrina, postalbúmina, anhidrasa carbónica y catalasa, a través de técnicas de electroforesis. Todas estas pruebas, a pesar de su utilidad, presentan ciertas limitaciones al momento de identificar un individuo, por eso se les llama pruebas de exclusión; lo que significa que en un caso de paternidad dudosa, estas técnicas no precisan quien es el verdadero padre de un animal, pero sí sirven para excluir a un grupo de animales que no lo sea (Bernal, 1997).

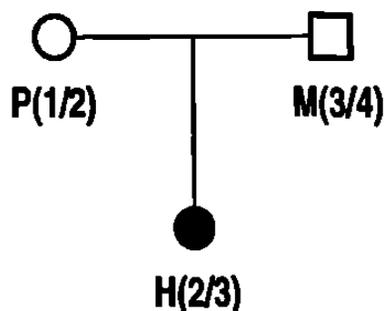
Hasta ahora se han mencionado dos métodos que involucran marcadores genéticos que tienen una utilidad práctica solo para excluir a un grupo de animales; esto se puede entender porque un grupo sanguíneo determinado puede estar presente en una gran cantidad de individuos. Debido a los bajos niveles de variación genética tanto en los grupos sanguíneos como para el polimorfismo de proteínas, estos métodos no brindan suficientes argumentos para determinar la paternidad (Bernal, 1997; Mommens *et al.*, 1998).

2.2.6 Marcadores de ADN

Como consecuencia de los avances en la tecnología, actualmente las técnicas de identificación basadas en los grupos sanguíneos y polimorfismo de proteínas, se han suplantado por métodos más poderosamente informativos como lo son marcadores de ADN. Las pruebas de paternidad analizan mediante marcadores localizados en diferentes cromosomas, la relación genética entre el hijo, y los supuestos padre y madre; este tipo de análisis es válido ya que el hijo hereda una combinación de alelos de un gen entre la madre y el padre. Los bovinos son organismos diploides, es decir que su material genético está en doble dosis, una heredada del padre y la otra de la madre.

Por ejemplo, para un marcador con ocho alelos, cada animal se identificará de acuerdo con el alelo que tenga el marcador, es decir por sus dos alelos, de manera que al observar un individuo con un genotipo 2/3, para ese marcador, se puede inferir que forzosamente sus padres tendrán alguno de estos alelos como se muestra en la figura 1 (Guizar-Vázquez, 2001).

Las pruebas de identificación de individuos más recientes consisten en analizar secuencias repetitivas altamente polimórficas del ADN, que tienen la característica de ser altamente variables entre individuos y tienen la ventaja de ser heredables de padre a hijo, lo cual permite identificar al padre con mucha mas seguridad (99.9 %). Debido a la probabilidad de exclusión que aporta la información de las secuencias repetitivas, lo que también hace menos posible que un animal que no sea el hijo presente el mismo polimorfismo del padre; con este tipo de análisis, por primera vez se puede hablar de pruebas de inclusión (Bernal, 1997; Usha *et al.*, 1995).



MARCADOR O GEN

ALELO	P	M	H
1	*		
2	*		*
3		*	*
4		*	
5			
6			

P= Padre

M= Madre

H= Hijo

1, 2, 3, 4, 5 y 6= Alelos de un mismo gen o marcador genético

Figura 1: Ejemplo de cómo se da la combinación de alelos provenientes del padre y la madre presentes en el hijo. Se ejemplifica un marcador o gen con seis posibles alelos (1 a 6, vertical). El padre presenta los alelos 1 y 2 (1/2), la madre los alelos 3 y 4 (3/4) y el hijo presenta una combinación de los alelos 2 y 3 (2/3) que aportaron a su información genética, el padre y la madre.

2.2.7 Marcadores genéticos de ADN

El ADN o material genético se encuentra organizado en estructuras microscópicas llamadas cromosomas; cada cromosoma contiene miles de genes. Los genes son tramos del ADN el cual está a su vez constituido por nucleótidos. Los nucleótidos son un complejo constituido por un azúcar, un fosfato y una base nitrogenada, de las cuales existen cuatro tipos que son: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). La secuencia de estos cuatro nucleótidos constituye la clave genética para la formación, desarrollo y funcionamiento de los seres vivos, ya que codifican la producción de proteínas. Entre las proteínas se encuentran las enzimas, las cuales son responsables de la síntesis y degradación de los demás componentes celulares, como otras proteínas, carbohidratos, grasas y los propios ácidos nucleicos como el ADN (Committee on DNA forensic Science and Commission on DNA forensic Science. 1996; Lehninger *et al.*, 1995).

Los genes cuentan con segmentos codificadores y no codificadores. Las secuencias codificadoras son conocidas como exones o secuencias de tipo I. Estas aportan información para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y constituyen tan solo el 10 % del ADN genómico; estas secuencias son únicas o se repiten muy pocas veces; mientras que las secuencias que no codifican para la síntesis de alguna proteína, incluyen los intrones que separan a los exones, algunas secuencias reguladoras de la expresión de genes (principalmente los promotores) y otras secuencias altamente repetitivas, como el ADN satélite. En total las regiones no codificadoras comprenden el otro 90% del genoma y las secuencias de tipo I son las que tienen la función de codificar proteínas, genes, cromosomas y ácidos nucleicos (Lehninger *et al.*, 1995).

La porción del ADN que no aporta productos y aún no se determina su importancia completamente, parece participar en la espaciación de los genes y como sitios de entrecruzamiento durante la meiosis, estas secuencias se denominan ADN satélite, el cual se considera un importante marcador genético en los estudios de genética molecular. (Committee on DNA forensic Science and Commission on DNA forensic Science. 1996.)

2.2.8 Tipos de polimorfismos en el ADN

Los polimorfismos del ADN se pueden detectar mediante fragmentos de restricción de longitudes polimórficas (RFLPs), repeticiones en tándem de número variable (VNTRs) y en las repeticiones cortas en tándem (STR). Cuando estos marcadores son referidos al criterio de selección para los esquemas de cruzamiento en animales de producción, entonces son llamados marcadores para la selección genética asistida (MAS). El uso de los marcadores genéticos en los animales tiene como finalidad investigar la cantidad de ellos existente, establecerlos en un mapa y detectar la relación entre éstos y los loci de características cuantitativas (QTLs), para posteriormente usar los QTLs en programas de mejoramiento genético (Committee on DNA forensic Science and Commission on DNA forensic Science. 1996; Dietz *et al.*, 1996; Goldstein y Schlötterer, 1999; Mewwissen y Arendonki, 1992; Ron *et al.*, 1994; Ron *et al.*, 1995).

Las secuencias altamente repetitivas distribuidas en el ADN, son clasificadas en minisatélites (ATCG)_n o microsatélites (AT)_n, cuentan con un patrón repetitivo más frecuente y por lo tanto aportan mayor polimorfismo a los marcadores genéticos lo que se traduce en más confiabilidad que el de los marcadores sanguíneos. Las pruebas de paternidad basadas en el análisis de microsatélites aportan un resultado confiable para los productores y comercializadores de semen y crías de animales de registro (Goldstein y Schlötterer, 1999; Lehninger *et al.*, 1995).

Las primeras secuencias de ADN satélite que se utilizaron como marcadores genéticos aplicados a identificación de individuos y pruebas de paternidad, fueron los minisatélites (VNTRs). Gracias a los constantes avances en este campo de la genética molecular y sobre esta misma línea de polimorfismos en el ADN, más adelante se descubrieron secuencias de mayor utilidad práctica, los microsatélites (Committee on DNA forensic Science and Commission on DNA forensic Science. 1996; Goldstein y Schlötterer, 1999). El uso de estos descubrimientos sirvió para desarrollar una metodología que permite por primera vez contar con una prueba de inclusión donde sí se puede precisar la paternidad discutida (Bernal, 1997).

2.2.8.1 ADN satélite

El ADN satélite consiste en repeticiones desde 6 a 35 bases y hasta 5 mega-bases de longitud que pueden llegar a constituir un gran porcentaje del genoma, lo cual los hace no prácticos para su análisis en el laboratorio para este tipo de estudios (Goldstein y Schlötterer, 1999).

2.2.8.2 Minisatélites

Los minisatélites o VNTRs, descritos por Wyman y White en 1980, son segmentos de ADN que consisten en repeticiones en tándem de un pequeño grupo de secuencias de bases nitrogenadas que no codifican y que se encuentran distribuidos en los telómeros y centrómeros de los cromosomas. Las regiones VNTR no son genes, por lo que su aplicación es solo para identificación de individuos; en estos sitios la secuencia que se repite consecutivamente a lo largo del cromosoma es de 6-35 hasta 500 pares de bases (figura 2) y el tamaño en pares de bases de la secuencia que se repite varía de individuo a individuo, es por eso que la secuencia del locus de un marcador contiene diferentes unidades repetitivas que son llamadas alelos (figura 4), o bien cada alelo significa un número diferente de repeticiones (Chakraborty, 1999; Goldstein y Schlötterer, 1999).

2.2.8.3 Microsatélites

Los microsatélites o STRs, son segmentos de ADN que consisten en repeticiones en tándem de 1 a 5 nucleótidos de longitud (figura 3). Los microsatélites están distribuidos en todo el genoma, son heredables y se puede determinar sus alelos en cualquier edad y a cualquier sexo.

Las secuencias de STRs se encuentran en la especie bovina, entre otros muchos sitios, en los intrones de genes que codifican en el complejo de histocompatibilidad mayor tipo II (PRB3), en el gen del esteroide 21-hidroxilasa (CYP21) y en el de la sub- unidad β de la hormona folículoestimulante (FSH), y todas estas regiones han demostrado tener un alto grado de polimorfismo en ganado bovino, que está condicionado a la cantidad de alelos que son formados de la misma forma que en los minisatélites como se muestra en la figura 4 (Goldstein y Schlötterer, 1999; Hirano *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1996; Mommens *et al.*, 1998; Oldroyd, 1998; Usha *et al.*, 1995).

En los STRs el número de repeticiones (alelos) varía mucho entre individuos no relacionados, pero se hereda de forma convencional como cualquier rasgo con herencia mendeliana simple. Cada microsatélite tiene variantes, las cuales permiten su utilización en el análisis de la genealogía, ya que permiten diferenciar entre animales no relacionados por paternidad. Estas variantes representan o se relacionan con los alelos de un gen a una característica determinada. De acuerdo con el tipo de repeticiones existen microsatélites dinucleótidos (CT CT CT CT CT CT), trinucleótidos (TCT TCT TCT TCT TCT) y tetranucleótidos (TCCT TCCT TCCT); de estos el más utilizado es el dinucleótido, donde el dinucleótido por ejemplo se puede repetir 10, 12, 18, 22 y hasta 40 veces $(CT)_n$, constituyendo la cantidad de repeticiones de la secuencia CT los alelos (polimorfismo) que pueden existir para ese microsatélite (Figura 3) (Goldstein y Schlötterer, 1999; Hirano *et al.*, 1996; Mommens *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1992; Oldroyd, 1998).



Figura 2: Distribución de la secuencia de un Minisatélite de 6 pb con 4 repeticiones en tándem (CTTTCT). Aquí se ejemplifica como se distribuye un minisatélite de 6 pb de longitud con la secuencia CTTTCT y se repite 4 veces, lo cual indica un alelo específico de este minisatélite.



Figura 3: Distribución de la secuencia de un Microsatélite de tipo dinucleótido (TC). Aquí se ejemplifica como se distribuye un microsatélite de 2 pb de longitud con la secuencia CT y se repite 11 veces, lo cual indica un alelo específico de este microsatélite.

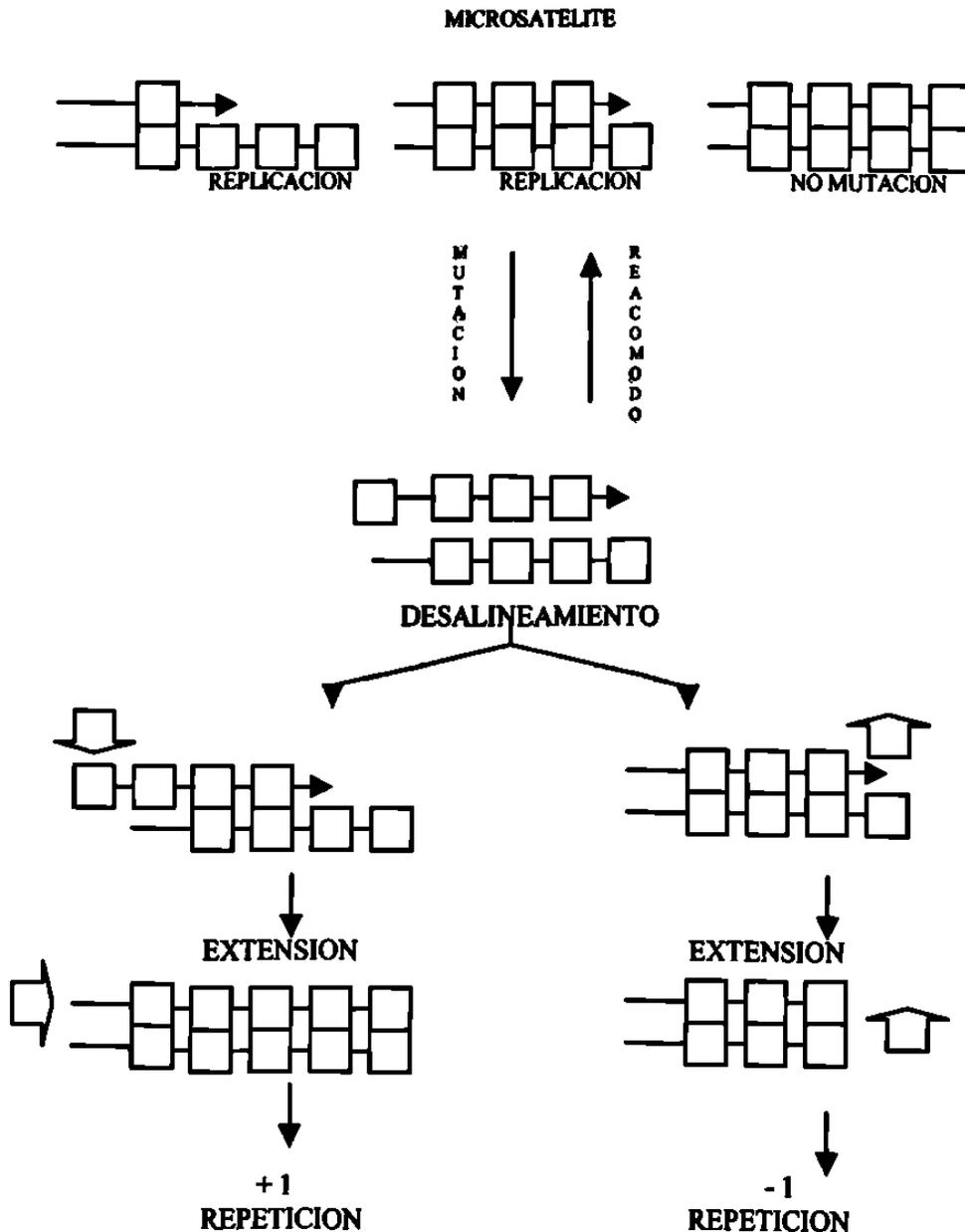


Figura 4: Modelo de el proceso de desarrollo para un loci de un microsatelite (Goldstein y Schlötterer, 1999). Cada cuadro en blanco del modelo del microsatélite significa una repetición de dinucleótido. En el primero y segundo bloque de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo se aprecia como se va conformando la replicación del dinucleótido con su respectiva banda complementaria. En el tercer bloque se aprecia la réplica sin cambio. En el cuarto bloque se ve cómo durante la replicación se puede producir un desalineamiento que conduce a un bloque conformado por una repetición menos 1 (columna derecha) o hacia un bloque conformado por una repetición más uno (columna izquierda).

2.2.9 Huella Dactilar de ADN

La biotecnología incursionó en el campo de la criminología con estudios de polimorfismos del ADN que en un principio fueron los minisatélites (Barrera, *et al.*, 1999) y actualmente los microsatélites. El biólogo molecular Alec Jeffreys en 1985 fue el primero en realizar este tipo de estudios aplicados a la criminología, obteniendo un patrón de bandas parecido a un código de barras que denominó huella digital del ADN o huella genética, mejor conocida con el anglicismo *fingerprinting*. Los marcadores moleculares de elección para estas pruebas son los VNTRs o minisatélites y los STRs o microsatélites. La huella dactilar de ADN, consiste en la representación de un patrón de bandas, único y específico de un individuo, obtenido a partir del análisis de una gran cantidad de polimorfismos en su ADN; dicho patrón de bandas está integrado por las combinaciones paternas y maternas de los alelos de cada polimorfismo dentro de su información genética. De esta forma la huella dactilar de ADN entre individuos es muy similar pero nunca será idéntica, por eso el perfil de ADN basado en polimorfismos, ha sido una de las técnicas de mayor utilidad en criminología, confirmación de la paternidad y en medicina forense (Committee on DNA forensic Science and Commission on DNA forensic Science. 1996; Guizar-Vázquez, 2001; Trommelen *et al.* 1993; Usha *et al.*, 1995).

2.2.10 Ventajas de los microsatélites

Para la realización de un perfil de ADN se han utilizado los RFLPs, el análisis de minisatélites y de microsatélites, pero cada uno presenta ventajas y desventajas sobre los demás, que son las siguientes (Caldwell, 1996; Usha *et al.*, 1995).

- Los RFLPs proporcionan baja heterocigocidad y bajo contenido de polimorfismo (PIC)
- La huella dactilar de ADN dada por minisatélites es difícil de interpretar y revela una variabilidad genética muy elevada.
- Los microsatélites ofrecen muchas ventajas sobre estos dos criterios anteriores como son las siguientes:
 - Son de elevada heterocigocidad
 - Se originan en loci definidos

- Los resultados que proporciona el PIC y la heterocigocidad son mucho más fáciles de interpretar
- Pueden ser amplificados mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ya que su longitud total se encuentra entre 100 y 300 pares de bases

2.2.11 Otros usos de los microsatélites

El genotipo proporcionado por las variantes alélicas basado en el análisis de cada microsatélite puede tener otras aplicaciones, además del diagnóstico de paternidad que se propone con este estudio y son las siguientes:

- Identificación de Individuos dentro de una población (Carleos *et al.*, 1999)
- Medicina forense y criminología (Committee on DNA forensic Science and Commission on DNA forensic Science 1996)
- Para determinar el tamaño de una población silvestre (van Hooft *et al.*, 1999)
- Mapa genético (Amarante *et al.*, 2000; Fries, 1993; Guerin *et al.*, 1999; Mezzelani *et al.*, 1995; Steffen *et al.*, 1993)
- Para determinar el grado de diversidad genética en poblaciones silvestres (van Hooft *et al.*, 1999; Schnabel *et al.*, 2000)
- Para estudios filogenéticos entre subespecies o especies muy relacionadas (Hanslik *et al.*, 2000; Jimenez *et al.*, 1999)

2.3 Análisis de la Genealogía

2.3.1 Técnicas de Biotecnología para análisis de paternidad

El análisis de los microsatélites en el ADN mediante PCR constituye una de las metodologías mas utilizadas actualmente en medicina veterinaria y en zootecnia, así como en otras disciplinas de las ciencias biológicas (Deacon *et al.*, 1989; Oldroyd, 1998).

La ventaja de los STRs para establecerlos dentro de una prueba de paternidad es por que a pesar de encontrarse en las secuencias de ADN tipo II, los microsatélites no están sujetos a la selección natural y por lo tanto presentan un alto grado de polimorfismo.

Además para su análisis en el laboratorio, son fácilmente detectables mediante colorantes no radiactivos; existen protocolos de amplificación de fragmentos de ADN (PCR), sugeridos para cada STR y permiten el uso de amplificaciones múltiples, ya que tienen numerosas variantes alélicas diferenciables en geles de poliacrilamida o en secuenciadores automáticos y se heredan de acuerdo a las leyes mendelianas (Ron *et al.*, 1993).

La PCR, es una técnica que amplifica una región del ADN flanqueada por un par de oligonucleótidos (iniciadores que seleccionan regiones específicas de los ácidos nucleicos por complementariedad de bases), que normalmente tienen una longitud de 15 a 30, las cuales se unen a regiones complementarias del ADN; la polimerización se logra gracias a una mezcla de dNTPs y la acción de la enzima ADN polimerasa-Taq. Esta mezcla de ingredientes necesarios para llevar a cabo la PCR se procesa en un termociclador y consiste en un conjunto de ciclos de tres pasos cada uno. En el primer paso se realiza la desnaturalización del ADN; el segundo denominado como *alineamiento*, consiste en la unión de los iniciadores con sus regiones de ADN complementarias y el tercer paso es la *extensión*, en la cual mediante la enzima polimerasa, se copia la región de ADN comprendida entre los iniciadores (Committee on DNA forensic Science and Commission on DNA forensic Science. 1996; Oldroyd, 1998).

El producto de la PCR puede ser resuelto mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. Esta técnica consiste en separar el producto de PCR por migración, basándose en su peso molecular, en sentido negativo (cátodo) a positivo (ánodo) de los electrodos de una cámara de electroforesis; todo esto se realiza mediante la preparación de un gel ya sea de agarosa o poliacrilamida.

La agarosa nos permite resolver fragmentos de ADN y también la presencia del producto amplificado mediante la PCR; en este caso que se analizaron los microsatélites, nos permite apreciar la banda correspondiente al peso molecular del rango esperado en cada STR, pero no brinda una amplia resolución como ocurre en el gel de poliacrilamida, donde se aprecian las combinaciones de los alelos (determinadas por su peso molecular individual) presentes en la banda del STR analizado (Chris *et al.*, 1996; Henegariu *et al.*, 1997).

Los STRs se han analizado en estuches para amplificación simultánea mediante PCR múltiple. Esta metodología permite amplificar varios microsatélites al mismo tiempo y en el mismo tubo de reacción, lo cual tiene la ventaja de que ahorra reactivos y tiempo. El uso de escaleras alélicas, permite una determinación muy precisa del tamaño de los productos de PCR y la comparación de resultados entre laboratorios.

2.3.2 Análisis estadístico

Para evaluar la utilidad de los microsatélites seleccionados en el análisis de la genealogía en las diversas razas y población de ganado bovino, es necesario obtener información acerca del número y frecuencia de alelos de los mismos (contenido de información de polimorfismo), así como de la probabilidad de exclusión que se obtendría con su utilización (Ron *et al.*, 1995; Usha *et al.*, 1995; Vankan y Faddy, 1999). Botstein *et al.* en 1980 utilizaron el contenido de información polimórfica (PIC) y heterocigocidad (H) para un estudio realizado con marcadores RFLPs en individuos caucásicos (humanos) y la información obtenida en ese estudio fue determinante para indicar que un loci altamente informativo es aquel cuyo PIC es $>$ que 0.5, un PIC de entre 0.25 y 0.5 medianamente informativo y todo aquel PIC $<$ de 0.25 solo ligeramente informativos; determinando entonces que los loci muy cercanos a 1 o igual que 1 son los más deseables pues contienen una gran cantidad de alelos (Botstein *et al.*, 1980; Devlin y Risch, 1992a).

Con los métodos tradicionales de diagnóstico de paternidad (tipificación sanguínea y polimorfismo de proteínas), se comprueba que es imposible excluir a determinado individuo como progenitor de ciertos descendientes, por lo que se puede registrar como tal en el certificado genealógico. En otras ocasiones el progenitor supuesto puede ser excluido como tal con una alta probabilidad del 95% (Botstein *et al.*, 1980).

La Probabilidad de Exclusión (PE), es la probabilidad de que un individuo sea acusado erróneamente o sea excluido como posible padre, cuando una madre y su hijo son tipificados.

La PE de un STR se obtiene de la relación existente entre las frecuencias de todos los alelos encontrados para ese marcador en la raza en cuestión; éste valor estadístico incrementa su poder al hacer un análisis combinado de la PE de cada STR, ya que se disminuye la probabilidad de que un genotipo dado por un panel amplio de STRs, heredado a un hijo sea igual en un individuo que no lo sea (Cerdeña, 1995; Usha *et al.*, 1995).

Por otra parte el Poder de Discriminación (PD), es la probabilidad de encontrar dos personas que coincidan para los marcadores genéticos incluidos en el estudio. La PD de un STR se obtiene de la suma de todas y cada una de las posibles combinaciones de sus alelos (frecuencias genotípicas) encontrados; éste valor estadístico incrementa su poder al hacer un análisis combinado de la PD de cada STR, ya que se disminuye la probabilidad de que un genotipo dado por un panel amplio de STRs, sea igual entre individuos (Cerdeña, 1995).

El análisis de frecuencias, también se puede traducir en el índice de paternidad ($IP=X/Y$), que nos dice cuántas veces lo observado se explica por relación biológica, más que por coincidencia, donde X es la probabilidad del supuesto padre de transmitir los alelos que porta y que también están en el niño (igual a 1), mientras Y es la frecuencia de los alelos en la población en general (Guizar-Vázquez, 2001).

Otro parámetro que se toma en cuenta para interpretar una prueba de paternidad como se pretende en este estudio, es el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW). Para interpretar paternidad basado en análisis estadístico, es necesario acoplar éstas al tipo de segregación genética de los bovinos, ya que las técnicas que evalúan microsatélites para su empleo en pruebas de paternidad en humanos utilizan el equilibrio Hardy-Weinberg y los bovinos son poblaciones con casi siempre desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg. El desequilibrio se puede dar por que estos métodos no han sido diseñados para usarse con tamaños de muestra pequeños, ya que el número de alelos presente en un locus por lo general es grande (Usha *et al.*, 1995).

El equilibrio de Hardy-Weinberg (Devlin y Risch, 1992b) indica la diferencia existente entre las frecuencias de los alelos de un marcador genético.

Por lo tanto se entiende que si no existen diferencias estadísticamente significativas en una prueba de homocigocidad, prueba exacta o prueba de razón de la verosimilitud < 0.05 (Cerdeña, 1995), entonces la población no se encuentra en equilibrio de HW.

Una explicación del desequilibrio de HW, puede ser que los hatos de ganado bovino generalmente están formados por individuos altamente relacionados en su conformación genética ya que un solo semental puede dar origen a una gran cantidad de descendientes y entonces un genotipo se puede repetir con casi la misma frecuencia que el resto de combinaciones alélicas por marcador. Otra explicación se debe a el tamaño y origen de la muestra, que son muy limitados para determinar una población en equilibrio HW (Chakraborty, 1999). Por lo tanto el equilibrio HW es opuesto al equilibrio de unión o parentesco (Usha *et al.*, 1995). Por eso cuando se sabe que existen ancestros comunes, se debe calcular la probabilidad de que la relación o parentesco se deba al azar, es decir la probabilidad de que al tomar un individuo al azar de la población, también coincida con la evidencia. Por ejemplo, en un perfil de ADN donde los genotipos encontrados con los marcadores A, B y C fueran 5/8, 4/11 y 13/13, respectivamente, el primer paso sería estimar la frecuencia de los tres genotipos encontrados. Para esto se consideran las frecuencias de los alelos implicados y se utiliza el equilibrio de HW, para determinar la frecuencia de cada genotipo, los cuales finalmente se multiplican para determinar la frecuencia de este perfil de ADN (Guizar-Vázquez, 2001).

Como se mencionó antes, éste es un criterio más para ser incluido al momento de interpretar los resultados estadísticos, pues un PE bajo puede representar este tipo de poblaciones o un muestreo limitado que es de suponerse resultan con desviación del equilibrio HW o en equilibrio de unión o parentesco (Usha *et al.*, 1995).

En el presente estudio se utilizó PCR para el análisis del número y frecuencia génica de las variantes alélicas de 8 microsatélites, los cuales ya han sido caracterizados a nivel secuencia de nucleótidos y tienen protocolos de PCR establecidos. Con estos datos se determinó el valor de estos marcadores para el análisis de la genealogía en la población de bovinos de registro local, mediante el cálculo de H, PIC, PE y PD de los microsatélites individuales y en conjunto.

En este trabajo se planteó determinar las variantes de los ocho microsatélites que se encuentran presentes en las razas de bovinos Beefmaster y Ganado Suizo en el estado de Nuevo León, así como estimar su frecuencia génica para establecer las pruebas de paternidad y ofrecer un servicio seguro de tecnología avanzada a los criadores de bovinos, así como proporcionar datos para establecer un mapa genético de estas razas de bovinos presentes en México

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo General

Establecer una prueba confiable para la identificación permanente y la verificación de la paternidad en los bovinos del Noreste de México, con el uso de un panel de 8 microsatélites.

2.4.2 Objetivos Particulares

1. **Evaluar varios métodos de extracción de ADN y estandarizar el método más confiable.**
2. **Estandarizar el protocolo de PCR simple**
3. **Estandarizar el protocolo de PCR múltiple**
4. **Estandarizar la separación de alelos por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida.**
5. **Realizar pruebas de campo con 54 animales de Ganados Suizo y 59 de Beefmaster.**
6. **Determinar la frecuencia genotípica y alélica de 8 microsatélites en la población de ganado Beefmaster y Ganado Suizo de registro en el área de distribución bovina en el Noreste de México.**
7. **Estimar la heterocigocidad, probabilidad de exclusión y poder de discriminación individual y usando el panel total de los 8 microsatélites, para su interpretación en pruebas de paternidad.**

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de realización de la Tesis

El presente estudio se realizó en la Unidad de Biotecnología Animal (UBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León. En la estandarización de las técnicas de extracción de ADN, se recibió asesoría de la Facultad de Biología de la UANL; para la realización de los PCR múltiples y la técnica de separación de alelos en poliacrilamida, se recibió asesoría de la Facultad de Medicina de la UANL y el uso del secuenciador automático en la determinación del tamaño de los alelos encontrados se llevó a cabo en el departamento de Patobiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Texas A&M, USA. El análisis genético- estadístico fue realizado en el Departamento de Genética de Poblaciones del CIBIN, IMSS.

3.2 Reactivos

BIO 101 Agarosa, catálogo 2310-302 lote 2310-302-9103

BIO-RAD: InstaGene™, catálogo 732-6211.

ICN BIOMEDICALS: UREA catálogo 194857 lote R4668

JALMEK CIENTÍFICA: Etanol al 100% (E 5325-15 lote 0-08-027E53); NaCl (lote 0-05-3005S23);
NaHCO₃; NH₄Cl (lote 0-07-3005A50).

LIFE TECHNOLOGIES: DNAzol catálogo 10503.

OPERON: Iniciadores de microsátélites; BM1824, BM1824F®, BM2113, BM2113F&, SPS115, SPS115FL, ETH3, ETH3F®, ETH10, ETH10F&, ETH225, ETH225L, TGLA122, TGLA122F®, TGLA126, TGLA126F&, TGLA227 y TGLA227FL.

PRODUCTOS QUÍMICOS MONTERREY: Acido bórico (05102 lote 837201) y EDTA (05802 lote 834504).

PROMEGA: Polimerasa Taq, buffer de reacción y magnesio M1665

RESEARCH ORGANIC: Proteinasa K liofilizada P6556

SIGMA: Acrilamida base (A-3553 lote 87H00331); Acrilamida Bis (M-7279 lote 97H0591); Agarosa A-9539 lote 19H0722; Agua ultrapura libre de ADNAsas y ARNAsas (W-4502 lot 39H8416); Azul de bromofenol (B-8026 lote 37H08); Bromuro de etidio (E-8751 lote 68H3640); Dinucleótido trifosfato (dNTP's: dCTP, dGTP, dTTP, dATP) Kitt para PCR (R36/37/38, S26-36); Formamida desionizada (F-9037 lote 49H0722); Genomic DNA isolation kitt GDI-38 lote 39H0645); Glicerol (G-8773 lote 57H0679); Marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb (D7808); Persulfato de amonio (catálogo 144-55-8lote 05-3005516); SDS (L-4390 lote 128H141215); TEMED (T-9821 lote 17H0219); Tris-HCl (T3253 lote 19H5402); Xilene Cyanole (C.I. 42135 lote 39H3603).

3.3 Equipo

BIORAD: Cámaras para electroforesis horizontal MINI-SUB CELL GT B170-4408; WIDE MINI-SUB CELL GT y la SUB-CELL GT B179-4483; Fluor-S™ Multilmager (423BR0200); Micropipeta de 0.5 a 10µl (B166-0505EDU); Power PAC 200 (serie 284BR 04355); Power PAC 3000 (system mod 1655056 serie 288BR1395 cat. 165-3804); Sequi Gen^R GT serie 368BR 01301; Transiluminador UV transiluminator 2000.

BENDER&HOBEIN AG: Vortex Genie

CORNING: PHmetro 430 serie 006191

EPPENDORF: Microcentrífuga 5415C

Espectrofotómetro

EXPLORER: Balanza analítica E11140 SN D007024738

KOTTERMAN: Baño María

LABNET-BIOPIPET: Micropipeta de 2 a 20 µl BP20 8cat. P3960-20); Micropipeta de 20 a 200 µl (VE-200 cat. P3945-200); Micropipeta de 100 a 1000 µl (BP1000).

MJ-RESEARCH INC: Termociclador de placa caliente PTC-100™

MISONIX: Campana de flujo laminar PCR work-station

MAYTAG: Congelador a menos 20°C Admira 2-35583-001 REV.00

OHAUS: Balanza CT1200 serie 12661

PERKIN-ELMER: Secuenciador Automático ABI

SIGMA: Cámara vertical de electroforesis Chemical (modelo Z35 cat. 280-2) y Cámara Polaroid (cat. F4638).

TELISA[®]: Termoagitador FE-311 serie 288BR1395

WHITE-WESTINGHOUSE: Refrigerador convencional

3.4. Material

AXYGEN: Puntillas para micropipeta de 1000 µl T-1000-B 301-01-051; puntillas de 200 µl; puntillas de 0.5 a 10 µl cat.T-3000 301-03-051; tubos eppendorff de 1.5 ml cat.MCT-150-C lote 311-08-51; tubos de 0.5 ml cat. 2236 430-8, 32108; tubos de 0.2 ml con tapa convexa PCR-02-C, lote 321-02-051.

AMERICAN NATIONAL CAN: Papel Parafilm

BIOMOL: Gradillas para tubos de 1.5, 0.5 y 0.2 ml, matraces de vidrio de 50, 100 y 250 ml; probetas de 1000, 500, 250, 50 y 10 ml.

TERUMO: Tubos al vacío con EDTA VT-100SP lote 0008008; agujas de punción 22 X 34, MN-2138M lote 0001031.

UNI SEAL: Guantes de látex lote 28000427 y cubre bocas

3.5 Origen de la Muestra

Para el presente estudio se obtuvieron muestras de sangre de 180 bovinos Beefmaster y 150 de Ganado Suizo. Las muestras provienen de animales seleccionados al azar en cada uno de los siguientes hatos:

- a) De la Unión Ganadera Regional de Nuevo León se muestrearon 80 bovinos Beefmaster y 50 de Ganado Suizo.
- b) Del Centro de Desarrollo de Genética Bovina (Tamaulipas) se muestrearon 100 bovinos Beefmaster.
- c) De Huixtla, Chiapas se muestrearon 100 bovinos de Ganado Suizo.

3.6 Obtención de las muestras

Para este estudio se tomaron muestras de 5 ml de sangre periférica completa. Cada muestra de sangre se obtuvo de la vena coccígea que se localiza en la porción media de la cara caudal en la región coccígea vertebral entre la primera y tercera vértebra de ésta región anatómica. Inmediatamente después de realizada la punción, la sangre fue puesta en los tubos con EDTA como anticoagulante, homogenizada cuidadosamente por inversión para que no se formaran coágulos o hemólisis y cada muestra fue identificada con el número de arete o tatuaje del bovino. Para su transportación fue mantenida en hieleras con refrigerante químico y para su almacenaje la sangre fue guardada en refrigeración a 4°C.

3.7 Extracción de ADN

Al inicio de la investigación se comenzó utilizando el estuche de extracción de BioRad1, posterior a esto se compró otro estuche de extracción de ADN diferente al primero, (Tabla 1) y además se recibió asesoría sobre la implementación de técnicas de extracción que utilizan soluciones preparadas en el laboratorio. Como resultado de este proceso se analizó el éxito de cada método comparando los resultados obtenidos con cada método implementado (tabla 1). Las técnicas de extracción de ADN que se probaron (tabla 1) y el tipo de muestras que se analizaron para esta evaluación fueron los siguientes:

Tabla 1: Métodos de extracción de ADN

MÉTODO	TIPO DE MUESTRA
FENOL CLOROFORMO	Sangre nueva
FENOL CLOROFORMO	Sangre vieja
TSNT	Sangre nueva
DESALADO	Sangre nueva
DESALADO	Sangre vieja
SIGMA	Sangre nueva
BIORAD 1	Sangre nueva
BIORAD 2	Sangre nueva
BIOMOL	Sangre nueva

Las muestras para la extracción de ADN fueron tomadas a su vez de muestras de sangre al azar y todas pertenecen a bovinos, de la raza Beefmaster y Ganado Suizo. Para verificar el éxito de la extracción de los ADNs fueron analizados en un gel de agarosa al 0.8% a 75 volts por 20 minutos, posteriormente teñido en bromuro de etidio por cinco minutos y apreciado en el transiluminador de luz ultravioleta.

Se realizó extracción de ADN al total de muestras de sangre de bovinos de Ganado Suizo y al total de muestras de sangre de bovinos Beefmaster. Después de probar diferentes métodos de extracción, el que mejor se adaptó a las necesidades de nuestro estudio, fue el método desalado, el cual utiliza dos soluciones de lisis, una para los eritrocitos y otra para glóbulos blancos.

A partir de 5ml de sangre periférica se hacen de tres a cinco lavados con la solución para lisis de eritrocitos (NH_4Cl 155mM, NaHCO_3 10mM, EDTA 0.1mM, pH 7.4), hasta obtener una pastilla blanca (para 500 μl de sangre se usan 900 μl de solución). En cada lavado se realizó el mismo procedimiento que es pipeteo y agitación hasta deshacer la pastilla, incubación a 4°C por 10 a 15 minutos y la posterior centrifugación 14,000 rpm por 15 minutos para obtener la pastilla.

La otra solución que lleva a cabo la lisis de leucocitos (TRIS-HCl 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM, Ph 8) se utilizó a razón de 300µl por cada 500µl de sangre base. A esta mezcla se adicionó Proteinasa K (10 mg/ml) y SDS (10%). En el caso de extracciones a partir de 500µl de sangre, se utilizaron 7µl y 20µl respectivamente de estas últimas dos soluciones; para posteriormente incubar toda la mezcla de 56°C a 58°C durante una a cuatro horas.

Posterior a esto se precipitan las membranas celulares con 100 µl de NaCl 6M, se recupera el sobrenadante (previa centrifugación por 15 minutos a 14,000rpm) y se precipita éste con dos volúmenes de etanol al 100%, se obtiene una pastilla de ADN por centrifugación de cinco minutos a 14,000rpm y se enjuaga la pastilla con 700µl de etanol al 70%, se centrifuga otros tres minutos a la misma velocidad, se elimina el exceso de etanol y se seca la pastilla.

Por último, se resuspende en 100µl de TE 1X (TRIS-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0) y se calientan las muestras a 90°C, para inactivar la acción de la proteinasa K. Para estimar la cantidad de ADN a utilizar en el PCR, las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X (Tris-acetato, 0.04M; EDTA, 0.001 M) y corridas a 75 volts por 20 minutos en una cámara de electroforesis vertical (MINI-SUB CELL). El ADN se almacena congelado a -20° C y las porciones para trabajo diario en PCR se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

3.8 Protocolo para el análisis de los STRs

Para el análisis de las muestras los ADNs, se prepararon las condiciones de la concentración de los iniciadores, para amplificación individual y en mezcla de los STRs y el protocolo para los geles de agarosa y poliacrilamida.

3.8.1 Preparación de los iniciadores.

Se realizó la lectura de los iniciadores con el fin de obtener datos seguros para manejar las concentraciones recomendadas. Henegariu *et al.* en 1997 recomienda iniciar experimentos de prueba desde concentraciones de 0.5µM de cada iniciador de STR. Para iniciar el protocolo de análisis de STRs se necesitó tener la información acerca de su secuencia en el ADN, su localización en los cromosomas y el rango en pb de cada STR (Tabla 2).

Tabla 2: Características de cada STR.

STR	Tamaño (pb)	Chr	Secuencia de iniciadores
BM 1824	178- 190	1	1: GAGCAAGGTGTTTTCCAATC (21pb) 2: ●CATTCTCCAACCTGCTTCCTTG (21pb)
BM 2113	125- 143	2	1: GCTGCCTTCTACCAAATACCC (21pb) 2: &CTTCCTGAGAGAAGCAACACC (21pb)
SPS 115	240- 262	15	1: AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG (24pb) 2: LAACGAGTGTCCTAGTTGGCTGTG (24pb)
ETH 9	117-129	19	1: GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG (22pb) 2: ●ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG (22pb)
ETH 10	210- 226	5	1: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA (23pb) 2: &CCTCCAGCCCACITTTCTTTCTC (23pb)
ETH 225	140- 156	9	1: GATCACCTTGCCACTATTTCT (22pb) 2: LACATGACAGCCAGCTGCTACT (21pb)
TGLA 122	130- 164	21	1: CCCTCCTCCAGGTAATCAGC (21pb) 2: ●AATCACATGGCAAATAAGTACATAC (25pb)
TGLA 126	109- 127	20	1: CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT (25pb) 2: &TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC (25pb)
TGLA 227	78- 104	18	1: CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT (24pb) 2: LACAGACAGAACTCAATGAAAGCA (25pb)

*En esta tabla se muestra el nombre de los STRs que se analizaron, el tamaño del segmento amplificado en pb, el cromosoma donde se localiza (Chr) y la secuencia de los nueve pares de iniciadores para cada STR (Chris *et al.*, 1996). Los caracteres ● (ROX), & (TET) y L (HEX) se refieren al marcador fluorescente en cada STR

Con base a la información comercial proporcionada por la compañía OPERON, cada iniciador de los STRs BM1824, BM2113, SPS115, TGLA122 y TGLA225; se diluyó en agua para PCR, dependiendo de los microgramos y peso molecular que de cada uno de ellos se utilizó una cantidad de agua en proporción a la misma cantidad de microgramos de cada iniciador (ejemplo: 385µg en 385µl), lo que quedó en una dilución a 250, de ésta dilución se pusieron 10 µl en 1000 µl de TE 1X en una celda de cuarzo para espectrofotómetro.

Cada iniciador de los STRs ETH3, ETH10 y ETH225, fueron diluidos en 1 ml de TE1X; para la lectura en el espectrofotómetro de estos últimos tres STRs (seis iniciadores), se pusieron 10 µl de la dilución previa en 1000 µl en una celda de cuarzo y se les agregó 1ml de TE 1X a cada uno. Esta dilución quedó 10 en 1000 µl o bien 100 veces diluido cada uno.

Una vez realizadas las diluciones fueron leídas en el espectrofotómetro a 260nm. Después de obtener los datos de la lectura en el espectrofotómetro se realizaron soluciones de trabajo de 20µl a 50 µM de todos los iniciadores de cada STR. Para el análisis individual de cada STR por separado se prepararon soluciones de trabajo a 5µM a partir de las de 50µM.

3.8.2 Procedimiento para visualizar geles con el Fluor-S™ Multimager

Para capturar un STR teñido con BE en un gel de agarosa al 0.8%, es necesario usar el Fluor-S™ Multimager bajo estas condiciones: estando activo el paquete computacional con el equipo Fluor-S™ Multimager, se selecciona la luz blanca para alinear el gel, después se activa el foco de luz ultravioleta junto con el filtro short pass. Una vez seleccionado esto, se le da un tiempo aproximado de 30 segundos de integración manual, para capturar la imagen en la computadora.

Para capturar la amplificación de un STR marcado con fluorescencia en un gel de agarosa al 0.8%, es necesario usar el Fluor-S™ Multimager bajo estas condiciones: estando activo el paquete computacional con el equipo Fluor-S™ Multimager, se selecciona la luz blanca para alinear el gel, después se activa el foco de luz ultravioleta junto con el filtro long pass. Una vez seleccionado esto, se le da un tiempo aproximado de 2 minutos de integración manual, para capturar la imagen en la computadora.

3.8.3 Condiciones para la PCR simple

La enzima Taq polimerasa, el buffer, el magnesio, los dNTPs y el agua para PCR, utilizados en este estudio fueron previamente listados en la sección 3.9.1.

Inicialmente cada marcador se analizó en forma individual, de manera que la primera parte del trabajo consistió en establecer las condiciones individuales de amplificación mediante PCR, como se muestra a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3: Condiciones para la PCR simple.

REACTIVO	CANTIDAD	CONC FINAL
Iniciador 1 (5 μ M)	1.25 μ l	0.25 μ M
Iniciador 2 (5 μ M)	1.25 μ l	0.25 μ M
DNTP's (2000 μ M)	2.5 μ l	200 μ M
Buffer PCR (Mg 20mM)	2.5 μ l	2.0mM
Agua PCR	16.25 μ l	———
Taq polimerasa 5U/ μ l	0.25 μ l	1.25U/25 μ l
ADN (50- 100ng/ μ l)	1 μ l	2-4ng/ μ l
Volumen final	25 μ l	

*Estas son las cantidades de cada reactivo para la PCR individual de cada STR bajo estas condiciones. Cada PCR se realizó en un volumen total de 25 μ l.

Cada STR amplificó bajo diferentes programas de amplificación en el termociclador (tabla 4) y la amplificación se verificó en geles de agarosa al 2% teñidos con BE y la electroforesis se corrió a 75 volts por 1 hora, como se indica en el punto 3.9 de éste capítulo (primer y segundo párrafo).

Tabla 4: Programa del termociclador para cada STR individual.

INICIADORE	DESNATURALIZACIÓN	30 CICLOS			EXTENSIÓN FINAL
		DESNATURALIZACIÓN	ALINEAMIENTO	EXTENSIÓN	
BM1824	94°C; 4'	94°C; 1'	58°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'
BM2113	94°C; 4'	94°C; 1'	63°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'
SPS115	94°C; 4'	94°C; 1'	64°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'
ETH3	94°C; 4'	94°C; 1'	66°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'
ETH10	94°C; 4'	94°C; 1'	66°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'
ETH225	94°C; 4'	94°C; 1'	62°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'
TGLA122	94°C; 4'	94°C; 1'	61°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'
TGLA126	94°C; 4'	94°C; 1'	60°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'
TGLA227	94°C; 4'	94°C; 1'	58°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'

*Aquí se muestra la temperatura, tiempo y repetición de cada ciclo del programa con que amplificó cada STR.

3.8.4 Condiciones para la PCR múltiple

Para agrupar los STRs se tomó en cuenta que no interfirieran factores como la temperatura de alineamiento, el marcador fluorescente y el tamaño esperado de cada STR, que se observó en la amplificación y visualización de los productos de la PCR (Tabla 5).

Tabla 5: Agrupación de los STRs.

Iniciador	MEZCLA1		Iniciador	MEZCLA2		Iniciador	MEZCLA3	
	MF	TM		MF	TM		MF	TM
BM1824		59°C	ETH3	66°C		TGLA122		65°C
BM1824F	HEX	61°C	ETH3F	66°C	HEX	TGLA122F	HEX	58°C
BM2113		63°C	ETH10	66°C		TGLA126		60°C
BM2113F	TET	63°C	ETH10F	66°C	TET	TGLA126F	TET	60°C
SPS115		63°C	ETH225	61°C		TGLA227		58°C
SPS115F	ROX	65°C	ETH225F	63°C	ROX	TGLA227F	ROX	59°C

*Por las características de su temperatura de emparejamiento y marcador fluorescente se agruparon para considerar los grupos de mezcla de iniciadores.

Las mezclas de los iniciadores fueron preparadas en soluciones de trabajo a concentraciones de $5\mu\text{M}$ cada uno a partir de las soluciones madre a $50\mu\text{M}$. Para las MEZCLAS 1 y 3, se tomaron $5\mu\text{l}$ de cada primer a $50\mu\text{M}$ para preparar el MIX de $50\mu\text{l}$ en una concentración final de $5\mu\text{M}$, en la MEZCLA 2 también se tomaron $5\mu\text{l}$ de cada primer a $50\mu\text{M}$ con excepción del ETH225F que quedó a una concentración de $7\mu\text{M}$, de este se tomaron $35.7\mu\text{l}$ para preparar la MEZCLA de $50\mu\text{l}$ en una concentración final de $5\mu\text{M}$ (Henegariu *et al*, 1997).

Para analizar los STRs en una sola mezcla para PCR, se prepararon las condiciones de cada reactivo mencionado a continuación, en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones para la PCR múltiple.

REACTIVO	CANTIDAD	CONC FINAL
Mezcla de Iniciadores ($5\mu\text{M}$)	$1.25\mu\text{l}$	$0.25\mu\text{M}$
DNTP's ($4000\mu\text{M}$)	$2.5\mu\text{l}$	$400\mu\text{M}$
Buffer PCR (Mg 25mM)	$2.5\mu\text{l}$	2.5Mm
Agua PCR	$13.25\mu\text{l}$	-----
Taq polimerasa $5\text{U}/\mu\text{l}$	$0.5\mu\text{l}$	$2.5\text{U}/25\mu\text{l}$
ADN ($50-100\text{ng}/\mu\text{l}$)	$5.0\mu\text{l}$	
Total	$25\mu\text{l}$	

*Estas son las cantidades de cada reactivo para la PCR múltiple de los STR bajo estas condiciones. Cada PCR se realizó en un volumen total de $25\mu\text{l}$.

La mezcla total de la reacción de cada mezcla de microsatélites se amplificó en el termociclador bajo las siguientes condiciones, que se muestran en la Tabla 7 y la amplificación se verificó en geles de agarosa al 2% teñidos con BE y la electroforesis se corrió a 75 volts por 1 hora, como se indica en el punto 3.9 de éste capítulo (primer y segundo párrafo).

Tabla 7: Programa en el termociclador para cada mezcla de iniciadores.

30 CICLOS					
MEZCLA DE INICIADORES	DESNATURALIZACIÓN	DESNATURALIZACIÓN	EMPAREJAMIENTO	EXTENSIÓN	EXTENSIÓN FINAL
1	94°C; 4'	94°C; 1'	56°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'
2	94°C; 4'	94°C; 1'	61°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'
3	94°C; 4'	94°C; 1'	56°C; 1'	72°C; 3'	72°C; 5'

*Aquí se muestra la temperatura, tiempo y repetición de cada ciclo del programa con que amplificaron las mezclas de los STRs.

3.9 Método de electroforesis

Para determinar el éxito de la PCR, después de terminado el ciclo de amplificación en el termociclador, se hizo una mezcla de 5µl de cada uno de los productos amplificados y 2µl de jugo azul 6X (azul de bromofenol, 0.25%; xilencianol, 0.25%); esta mezcla se colocó en un gel de agarosa al 2% sumergido en la cámara de electroforesis horizontal conteniendo TBE 1X (Tris-borato, 0.09µM; EDTA, 0.002µM), como amortiguador del corrimiento a 75 volts de 45 a 60 minutos.

Para verificar la existencia de las bandas resultado de una amplificación exitosa, el gel fue analizado en un sistema Fluor-ST™ Multimager con el cual se captó la fluorescencia emitida por los STRs. El tamaño de las bandas fue determinado en relación con el marcador de peso molecular de 100 a 1000pb. La escalera no contaba con fluorescencia por lo que se requirió teñir el gel con BE para verificar la relación existente entre las bandas y la escalera.

3.9.1 Separación de alelos en poliacrilamida

Para la separación de alelos de cada uno de los microsatélites amplificados mediante PCR, se realizó un gel de poliacrilamida desnaturizante al 5% como indica el manual del Sequi-Gen[®] GT y se corrió en un Sequi-Gen[®] GT a 500 volts por cuatro horas; posteriormente la tinción del gel se hizo con BE y su análisis se realizó en el Fluor-ST™ Multimager.

Para la preparación del gel de poliacrilamida al 5%, se requirió lo siguiente:

Urea	63 gm
TBE 10X	15ml
Acrilamida-bis (19:1) al 30%	25ml
Agua destilada	Aforar a 150ml

Primero se colocó la UREA con 33.07 ml de agua destilada en un vaso de precipitado y se colocó en el termoagitador magnético para disolver la UREA; una vez disuelta se agregó el TBE 10X (Tris-borato, 0.9 μ M; EDTA, 0.02 μ M), posteriormente la poliacrilamida al 30% y por último se aforó con el agua destilada a 150 ml en una probeta analítica.

Una vez que se tiene montado el Sequi gen como indica su manual de uso, se procedió a agregar al gel las soluciones que consiguen al gelificación de la mezcla total del gel de poliacrilamida, las cuales son:

TEMED	150 μ l
Persulfato de amonio al 10%	150 μ l

El gel debe vaciarse inmediatamente después de haber agregado y mezclado bien las 2 últimas soluciones. Se espera 1 hora a que polimerice el gel, se monta sobre su cámara de electroforesis, la cual debe contener buffer de corrimiento en gradiente de concentración (TBE 0.5X en la base y TBE 1X entre los vidrios verticales). Una vez montado el equipo de corrimiento se pre-corre por 30 minutos a 200V.

Después de haber pre- corrido el gel como se indicó, se procede a enjuagar bien cada carril para eliminar la urea cristalizada y que no interfiera en el corrimiento de la carga. Los productos de PCR tienen que ser desnaturalizarlos a 94°C por cinco minutos con un jugo de corrimiento que fue preparado de la siguiente forma:

Jugo Azul	1 μ l
Formamida desionizada	1 μ
Producto de PCR	3 μ l

3.9.2 Determinación de alelos en el ABI PRISM® 377 DNA Sequencer

Este tipo de estudios sobre análisis de genealogía en Medicina Veterinaria en México es nuevo y por lo tanto no contamos con la información sobre la frecuencia de alelos existente para cada STR por raza analizada en este estudio.

Debido a lo anterior, se requirió la cooperación del Departamento de Patobiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Texas A&M, para el uso de un secuenciador automático ABI PRISM® 377 en la determinación del tamaño exacto de los alelos presentes en los productos de PCR obtenidos en la FMVZ/UANL. El equipo que se utilizó en Texas fue un secuenciador automático que analiza el ADN de la PCR, teñido con múltiples colorantes fluorescentes, las muestras de la PCR se cargan en un sistema de gel vertical para que el producto migre separando sus bandas alélicas, debido a la electroforesis. El análisis en la computadora por la detección láser permite que la visualización de la separación de los alelos, se vea en tiempo real.

En este equipo el tamaño de los productos de la PCR se determina mediante un marcador interno de peso molecular, el cual se basa en la intensidad de la fluorescencia emitida (<http://www.appliedbiosystems.com/products/>).

En principio la técnica de separación de alelos en poliacrilamida queda reportada con el ejemplo de unas muestras, y el resto fue analizado en el secuenciador automático que se mencionó antes.

3.10 Método estadístico

Los datos se analizaron con los siguientes parámetros, para determinar las diferencias de las frecuencias génicas entre razas, (Usha *et al.*, 1995; Chakraborty, 1999).

- a) Número de alelos = conteo directo de variantes de cada alelo observado
- b) Frecuencia de alelos = # de observaciones de un alelo / # total de observaciones de todos los alelos.

c) Frecuencia genotípica = # de observaciones de un genotipo / # total de observaciones de todos los genotipos.

d) Heterocigocidad:

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

p_i = frecuencia del alelo i

e) Contenido de Información de Polimorfismo (PIC)

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

p_i = frecuencia del i -ésimo alelo

f) Equilibrio Hardy-Weinberg mediante la Prueba de Homocigocidad, Prueba de Razón de la Verosimilitud y Prueba Exacta.

g) Probabilidad de exclusión (PE), a partir de la relación existente entre las frecuencias de todos los alelos encontrados para ese marcador en la raza en cuestión

h) Poder de discriminación (PD), a partir de la suma de todas y cada una de las posibles combinaciones de sus alelos (frecuencias genotípicas) encontrados

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Resultados del muestreo

Se obtuvieron en total 180 muestras de sangre de bovinos Beefmaster y 150 de Ganado Suizo, con las cuales se hizo un banco de ADN en la UBA/FMVZ/UANL. Las muestras incluidas en este estudio pertenecen a este banco de ADN (tabla 8) del cual se incluyeron al azar, 54 de la raza PS y 59 de la raza BM. Los ADN del 1PS al 25 PS, proceden del muestreo realizado en Chiapas; mientras que los que tienen la identificación 26 PS a 54 PS, pertenecen al muestreo realizado en la Unión Ganadera Regional. Los ADN del 1 BM al 49 BM proceden de las muestras proporcionadas por el Centro de Desarrollo de Genética Bovina en Tamaulipas y los ADN con la identificación 50 BM a 59BM pertenecen al muestreo realizado en la Unión Ganadera Regional.

Tabla 8: Banco de ADN.

	Unión Ganadera Regional	Desarrollo de Genética Bovina	Huixtla, Chiapas	Total
PS	26PS a 54PS y 130PS a 150PS		1PS a 25PS y 55PS a 129PS	150PS
BM	50BM a 59BM y 111BM a 180BM	1BM a 49BM y 60BM a 110BM		180BM

*En el congelador de la UBA/FMVZ/UANL, se encuentran identificados los ADN de la raza Beefmaster del 1BM al 180BM y los ADN del Ganado Suizo del 1BM al 150BM.

4.2 Evaluación de métodos de extracción de ADN

Tomando en cuenta, el tiempo de almacenaje de la muestra, la cantidad y calidad de ADN que se obtuvo, se seleccionó el método desalado.

Este método fue el mejor debido a que funcionó tanto para muestras frescas como para las que tenían de 1 a 2 años de almacenamiento, las soluciones son fáciles de preparar y la calidad del ADN fue ideal para realizar la PCR, el único inconveniente comparado contra los estuches comerciales, fue el tiempo consumido en realizar una extracción, ya que con los estuches fue menor que con DESALADO (tabla 9).

Tabla 9: Resultados de los diferentes métodos de extracción.

MÉTODO	TIPO DE MUESTRA	TOTAL DE MUESTRA	+++ %	++ %	+ %	NEGATIVA %
FENOL CLOROFORMO	Sangre nueva	30	8	10	10	2
FENOL CLOROFORMO	Sangre vieja	30	0	5	10	15
TSNT	Sangre nueva	10	0	9	0	1
DESALADO	Sangre nueva	100	31	46	12	11
DESALADO	Sangre vieja	100	5	48	35	12
SIGMA	Sangre nueva	9	5	4	0	0
BIORAD 1	Sangre nueva	19	0	2	0	17
BIORAD 2	Sangre nueva	8	2	6	0	0
BIOMOL	Sangre nueva	13	4	7	2	0

*El resultado positivo de las extracciones de ADN se evaluó con los signos + para poco ADN (de 5ng a 20ng), ++ para concentraciones regulares (de 20ng a 50ng) y +++ para las muestras muy concentradas (de 50ng a 150 ng). Las de menos de 5ng o con nada fueron consideradas negativas.

Los resultados obtenidos con los diferentes métodos de extracción de ADN, se probaron en geles de agarosa al 0.8% teñidos con BE y visualizadas en el FluorS Multilmager (figuras 5 A y B y 6).

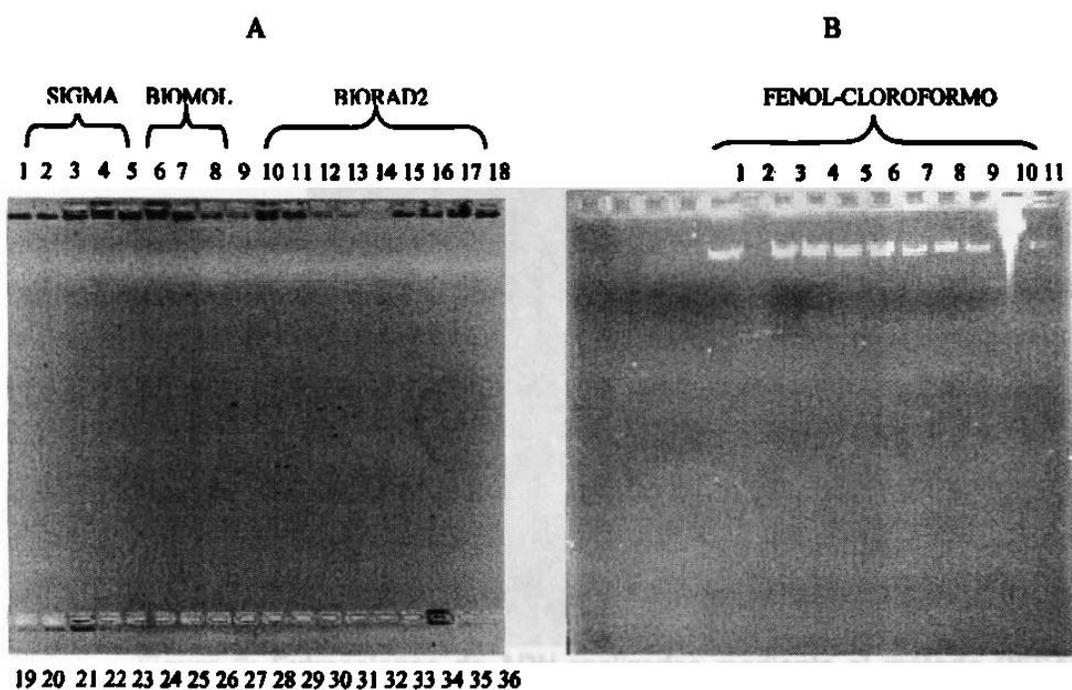


Figura 5: Muestra de extracciones de ADN realizadas con cinco de los siete diferentes métodos utilizados. En los carriles 1 a 5 son muestras de extracciones realizadas con el estuche comercial de Sigma, en los carriles 6 a 9, con el estuche de Biomol, del 10 al 18 con el estuche BioRad 2 y con el estuche BioRad 1 en los carriles 19 a 27(A). En los carriles 1 a 11 son extracciones realizadas con el método Fenol- Cloroformo (B).

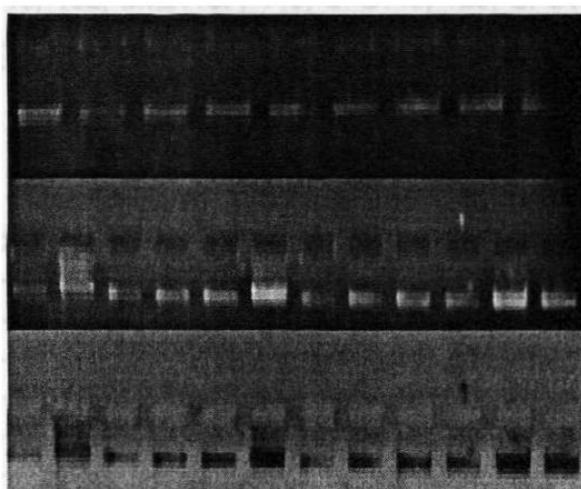


Figura 6: Extracciones de ADN realizadas mediante el método DESALADO. Tres geles que muestran verificaciones de ADN previas al PCR, realizadas con el método desalado.

4.3 Resultado de lectura de los iniciadores

Los iniciadores de nueve STRs fueron leídos en el espectrofotómetro, para hacer las diluciones necesarias para obtener soluciones de trabajo a 50 μM (Tabla 10). La concentración micromolar se obtuvo mediante la relación existente entre los microgramos originales de cada iniciador, el volumen total en que se hizo la dilución original, la dilución preparada para la lectura en el espectrofotómetro y el resultado obtenido de la absorbancia. El resultado en concentración micromolar, pertenece a la columna final de la tabla 9 y fueron los siguientes: para el BM1824, 181; BM1824F, 141; BM2113, 162; BM2113F, 119; SPS115, 125; SPS115F, 103; ETH3, 103; ETH3F, 127; ETH10, 77; ETH10F, 63; ETH225, 65; ETH225F, 61; TGLA122, 231; TGLA122F, 142; TGLA126, 133; TGLA126F, 178; TGLA227, 113 y TGLA227F, 108.

Tabla 10: Resultado de la lectura de los iniciadores en el espectrofotómetro.

Oligo	Dilución:	Absorbancia:	$\mu\text{g/ml}$:	vol total	μg totales	Conc μM
BM1824	251	0.1608	1331.9064	368	490.14	181
BM1824F	251	0.10935	905.74605	806	730.03	141
BM2113	251	0.1324	1096.6692	427	468.28	162
BM2113F	251	0.1084	897.8772	364	326.83	119
SPS115	251	0.1337	1107.4371	891	986.73	125
SPS115F	251	0.1039	860.6037	92	79.18	103
ETH3	101	0.26705	890.07765	1000	890.08	127
ETH3F	101	0.2111	703.5963	1000	703.6	93
ETH10	101	0.1821	606.9393	1000	606.94	77
ETH10F	101	0.1206	401.9598	1000	401.96	63
ETH225	101	0.13365	445.45545	1000	445.46	65
ETH225F	101	0.13365	445.45545	1000	445.46	61
TGLA122	251	0.1922	1591.9926	370	589.04	231
TGLA122F	251	0.16715	1384.50345	387	535.8	142
TGLA126	251	0.1494	1237.4802	409	506.13	133
TGLA126F	251	0.1697	1405.6251	405	569.28	178
TGLA227	251	0.11795	976.97985	501	489.47	113
TGLA227F	251	0.128	1060.224	61	64.67	108

*Los iniciadores de los STRs BM1824, BM2113, SPS115, TGLA122, TGLA126 y TGLA227 fueron diluidos en agua para PCR en una cantidad de líquido igual a la de su peso en μg ; mientras que los iniciadores de los STRs ETH3, ETH10 y ETH225 fueron diluidos en 1ml de TE 1X.

4.4 Preparación de los iniciadores

Una vez determinada la concentración de cada iniciador, se procedió a efectuar los cálculos correspondientes para hacer soluciones de trabajo de 20 μ l a 50 μ M, con la fórmula $V1C1 = V2C2$. Estas condiciones se muestran en la Tabla 11. Al realizar pruebas comparativas con concentraciones de 0.5 μ M y 0.25 μ M, la amplificación resultó con la misma calidad y además se disminuyó la intensidad de la banda de dímeros de iniciadores con la concentración de 0.25 μ M.

Tabla 11: Concentraciones que resultaron al preparar las soluciones de trabajo.

INICIADOR	V2C2/C1	V1	AFORAR / H2O	V2
BM1824	(20)(50)/181	5.5 μ l	14.5 μ l	20 μ l
BM1824F	(20)(50)/141	7.1 μ l	12.9 μ l	20 μ l
BM2113	(20)(50)/162	6.2 μ l	13.8 μ l	20 μ l
BM2113F	(20)(50)/119	8.4 μ l	11.6 μ l	20 μ l
SPS115	(20)(50)/125	8.0 μ l	12.0 μ l	20 μ l
SPS115F	(20)(50)/103	9.7 μ l	10.3 μ l	20 μ l
ETH3	(20)(50)/127	7.9 μ l	12.1 μ l	20 μ l
ETH3F	(20)(50)/93	10.8 μ l	9.2 μ l	20 μ l
ETH10	(20)(50)/77	13.0 μ l	7.0 μ l	20 μ l
ETH10F	(20)(50)/63	15.9 μ l	4.1 μ l	20 μ l
ETH225	(20)(50)/65	15.4 μ l	4.6 μ l	20 μ l
ETH225F	*			
TGLA122	(20)(50)/231	4.3 μ l	15.7 μ l	20 μ l
TGLA122F	(20)(50)/142	7.0 μ l	13.0 μ l	20 μ l
TGLA126	(20)(50)/133	7.5 μ l	12.5 μ l	20 μ l
TGLA126F	(20)(50)/178	5.6 μ l	14.4 μ l	20 μ l
TGLA227	(20)(50)/113	8.8 μ l	11.2 μ l	20 μ l
TGLA227F	(20)(50)/108	9.3 μ l	10.7 μ l	20 μ l

*Aquí se indican las cantidades exactas a tomar de cada dilución para preparar las soluciones de trabajo en PCR de 20 μ l a 50 μ M. *El iniciador del STR ETH225F quedó originalmente a 7 μ M, por lo que las soluciones madre se almacenaron a 7 μ M. V1: Cantidad buscada. C1: Concentración en la lectura espectrofotométrica, V2: Solución de trabajo 50 μ l, C2: Concentración deseada 50 μ M.

4.4.1 Fluorescencia emitida

Este experimento fue realizado para mostrar la eficiencia del equipo Multilmager para captar la fluorescencia de los microsatélites BM1824 y BM2113 visualizados sin teñir con bromuro de etidio (Figura 7A). También se muestra el mismo experimento pero ahora teñido con bromuro de etidio, en ésta figura sí se puede apreciar el marcador de peso molecular (Figura 7B).

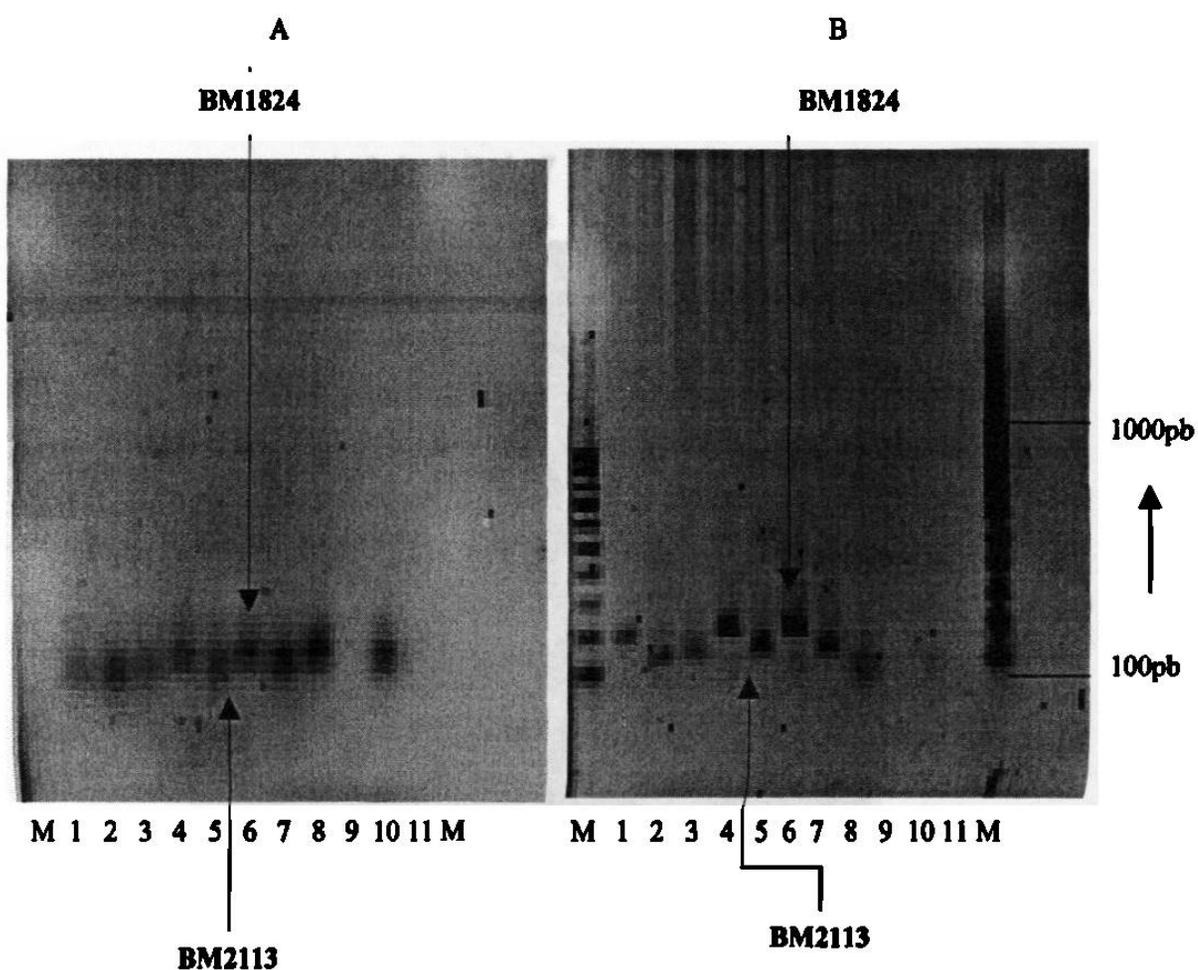


Figura 7: PCR de los STRs BM2113 y BM1824. Gel sin teñir que muestra la fluorescencia de los microsatélites BM1824 y BM2113 (A). El mismo gel y experimento teñido con bromuro de etidio (B). M=marcador de peso molecular; carriles del 1 al 10 5 muestras alternadas con los marcadores BM2113 y BM1824 y el carril 11 es un control negativo.

4.4.2 TGLA126F dañado

El STR TGLA126, no amplificó bajo ninguna TM semejante a la teórica (desde 56°C hasta 65°C), este experimento se realizó para verificar si el TGLA126 estaba en buenas condiciones y consistió en cargar diferentes cantidades directas del iniciador en un gel desnaturalizante al 5% de poliacrilamida y teñido con bromuro de etidio. El resultado fue el que se muestra en la Figura 8. La carga se realizó intercalando el TGLA126R y TGLA126F primero con 1µl directo de la dilución de los iniciadores para cada uno y los siguientes en forma ascendente hasta llegar a 6µl, las concentraciones, correspondieron a 0.35, 0.71, 1.07, 1.42, 1.78 y 2.14.

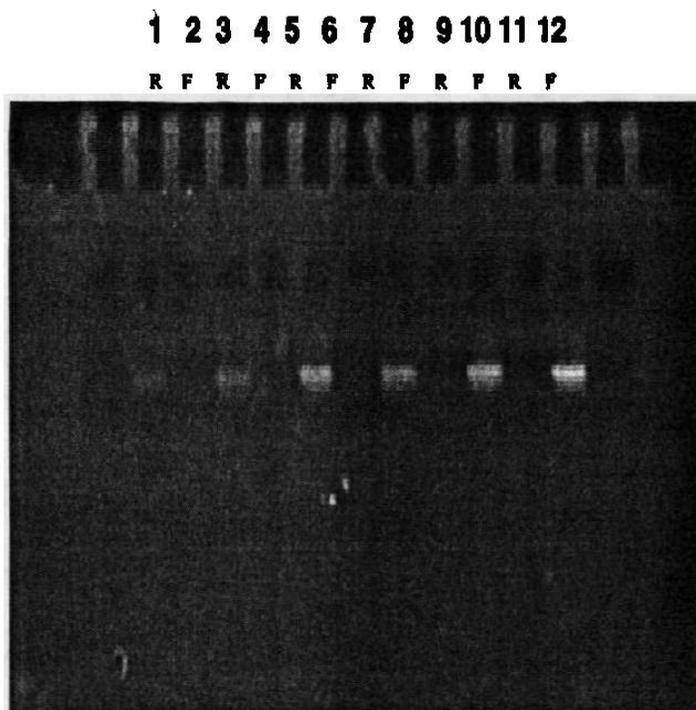


Figura 8: Determinación en gel de poliacrilamida de la cantidad y calidad de los iniciadores TGLA126R y TGLA126F. Gel de poliacrilamida al 5%, corrido por 20 minutos para determinar la fluorescencia defectuosa del STR TGLA126F. Cada carril fue cargado con cantidades diferentes de la dilución original de cada iniciador. En el carril 1 y 2 se cargó 1µl, en el 3 y 4, 2µl; en el 5 y 6, 3µl; en el 7 y 8, 4µl, en el 9 y 10, 5µl y en el 11 y 12, 6µl.

4.4.3 Amplificación individual de 8 STRs

Los microsatélites fueron amplificados de forma individual antes de realizar la amplificación en mezcla, los PCRs se realizaron bajo el mismo programa y a una misma TM. En la figura 9 A y B, se muestra este experimento donde se utilizaron los STRs BM1824, BM2113, SPS115, ETH3, ETH10 y ETH225.

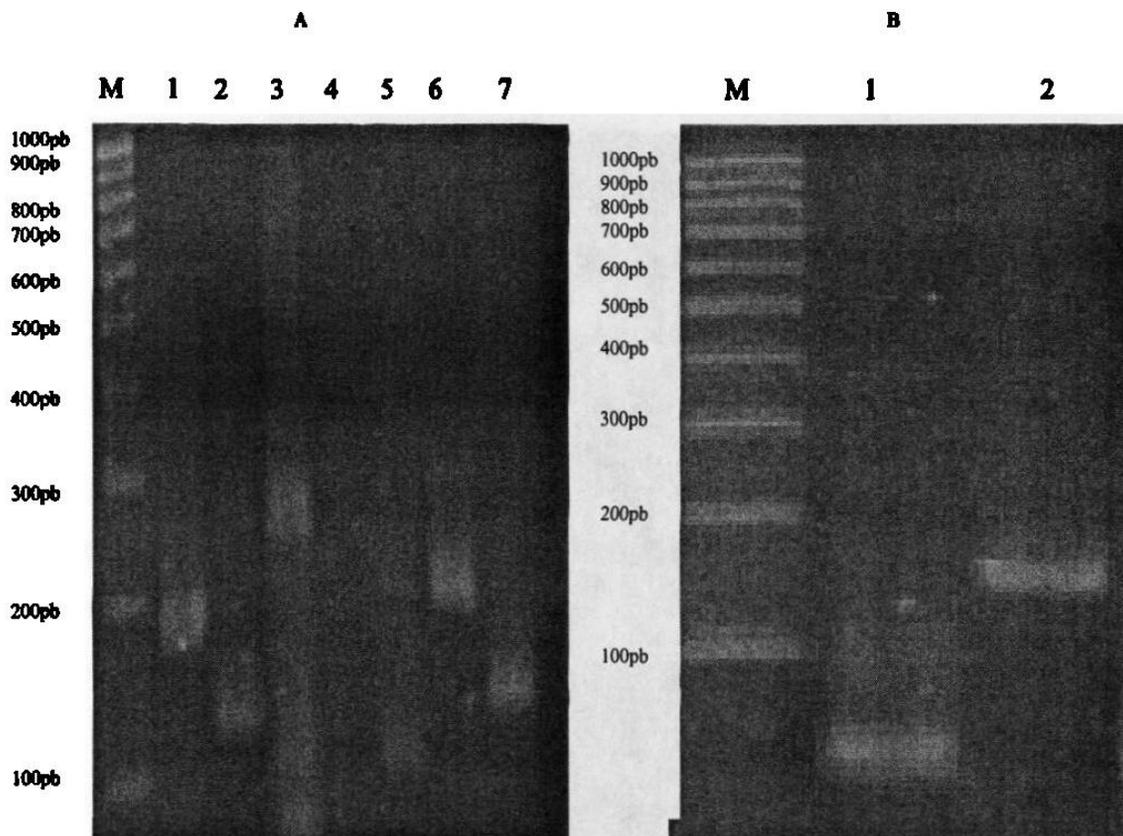


Figura 9 A y B: Representación de los 8 STRs amplificados por individual. En la figura 9A en el primer carril está el marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb; en el número 1 se encuentra el BM1824, en el 2 el BM2113; en el 3 el SPS115; en el 4 el ETH3, en el 5 el ETH10 y por último en el 6 el ETH225. Los primeros 3 se amplificaron en tubos independientes pero en la misma corrida de PCR (TM 56°C) y los 3 restantes de la misma forma (TM 61°C). En la figura 9B, se muestran los STRs TGLA227 y TGLA122 amplificados bajo las mismas condiciones (TM 56°C).

4.4.4 Amplificación en mezcla de los iniciadores

Después de haber quedado establecidas las condiciones de amplificación para cada STR se hizo PCR múltiple con los STRs BM1824, BM2113 y SPS115, en un mismo tubo de reacción (figura 10); del mismo modo se procedió a tratar los STRs ETH3, ETH10 y ETH225 en un PCR múltiple (figura 11). Aquí podemos ver que la banda correspondiente al ETH3 no se puede apreciar, por lo que decidimos amplificarlo de forma individual (Figura 11). Por último los STRs TGLA122 y TGLA227 tratados también en PCR múltiple (Figura 12).

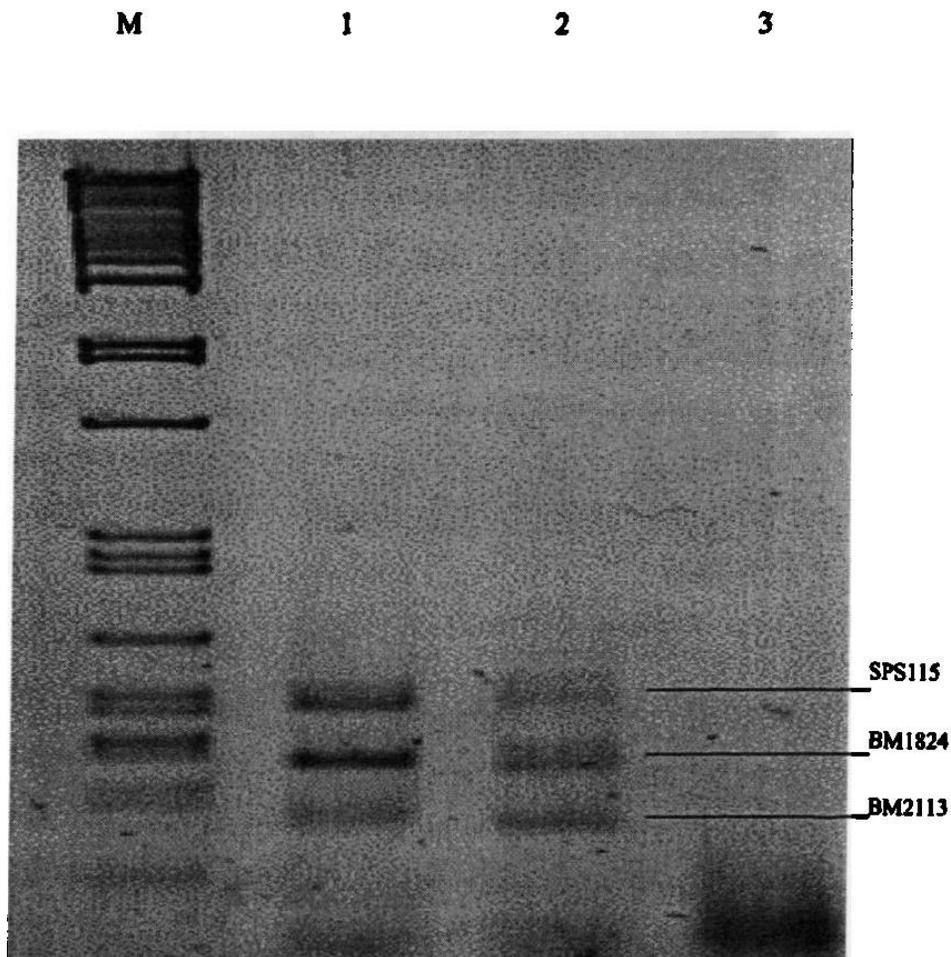


Figura 10: PCR en múltiple de los STRs BM1824, BM2113 y SPS115. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular pst-1, en los carriles 1 y 2 muestras de PCR múltiple y en el carril 3 está un control negativo.

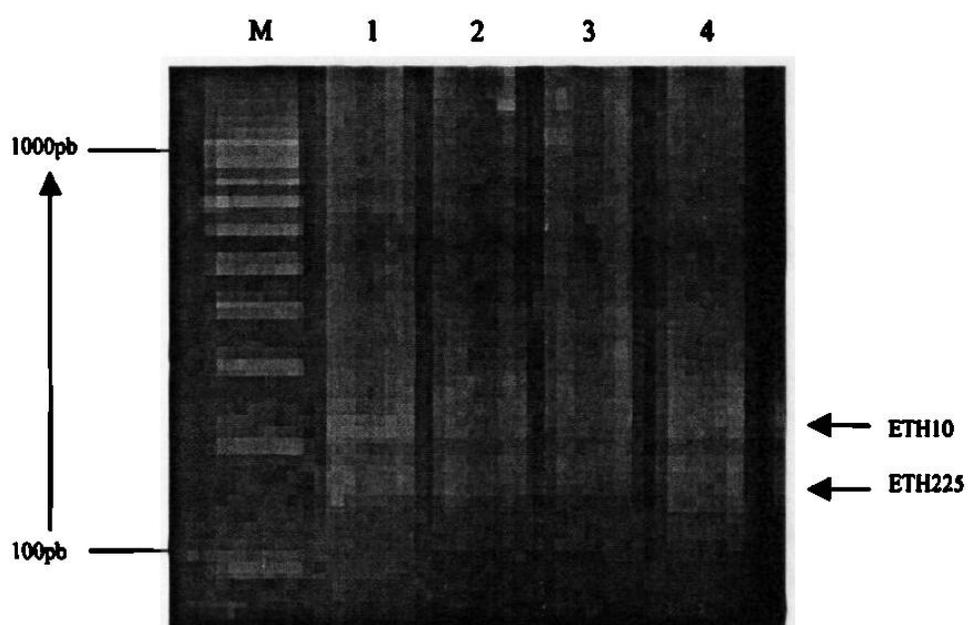


Figura 11: PCR múltiple de los STRs ETH3, ETH10 y ETH225. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 100 a 1000, en los carriles 1, 2, 3 y 4 muestras de PCR, la banda perteneciente al STR ETH3 no se aprecia.

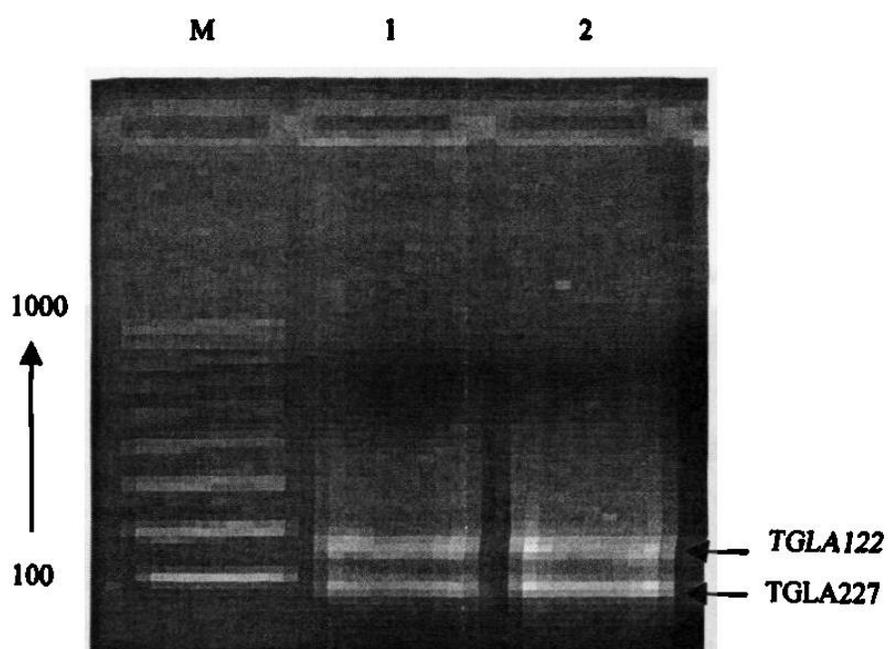


Figura12: PCR múltiple de los STRs TGLA 122 y 227. En el primer carril se aprecia el marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb, en los carriles 1 y 2 se ven las bandas pertenecientes a los STRs TGLA122 y TGLA227.

4.5 Gel de poliacrilamida

La metodología de la técnica en poliacrilamida para la separación de los alelos del marcador BM1824, se preparó un gel desnaturalizante al 5% (Figura 13) como se indica en el capítulo de Material y Método. En el primer carril se cargaron 5 μ l de la escalera 1000 pb solo como referencia, ya que el tamaño de los alelos se sabe por los resultados obtenidos con el secuenciador automático y los siguientes cinco carriles del gel fueron ocupados con la misma muestra de PCR perteneciente a un solo animal (bovino BM). El tamaño de los alelos que se aprecian son de 180 y 188 pb.

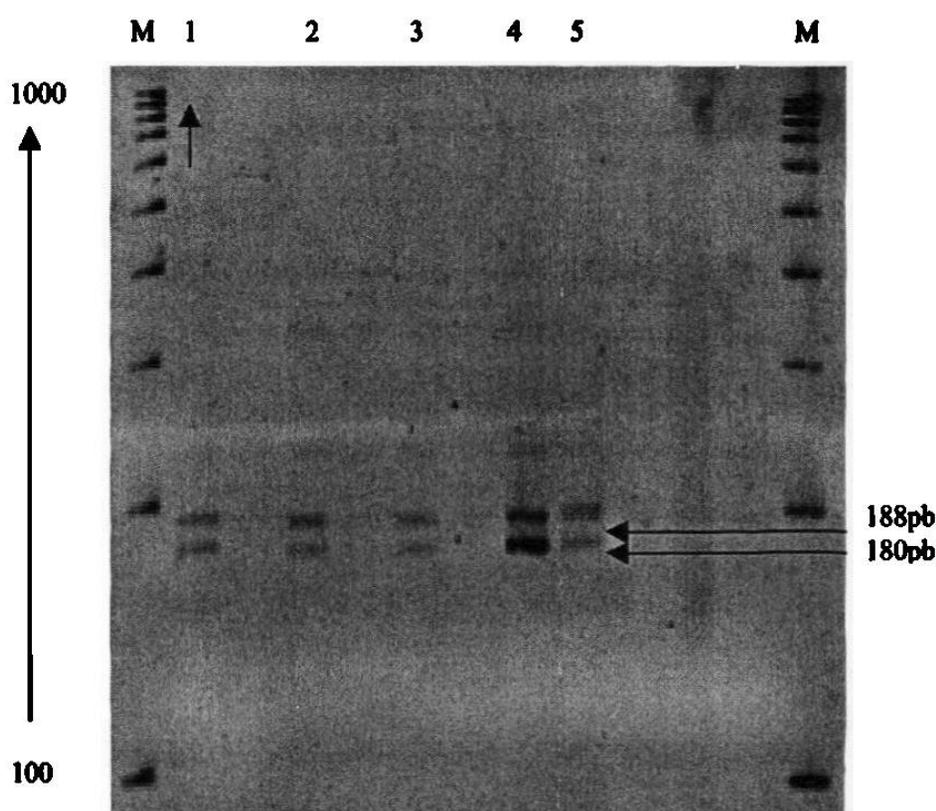


Figura 13: Apreciación de los alelos 180 y 188 del STR BM1824. M= marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb, carriles 1 a 5 muestra de PCR individual del STR BM1824.

4.6 Resultados con el secuenciador automático ABI

La determinación de los alelos se realizó en un secuenciador automático por que no contamos con una escalera alélica. Los resultados obtenidos con el secuenciador automático se determinaron a partir de la fluorescencia captada por el equipo ABI que consiste en determinar el tamaño de los alelos por la intensidad de la banda de cada alelo representada en picos gráficos (figura 14).

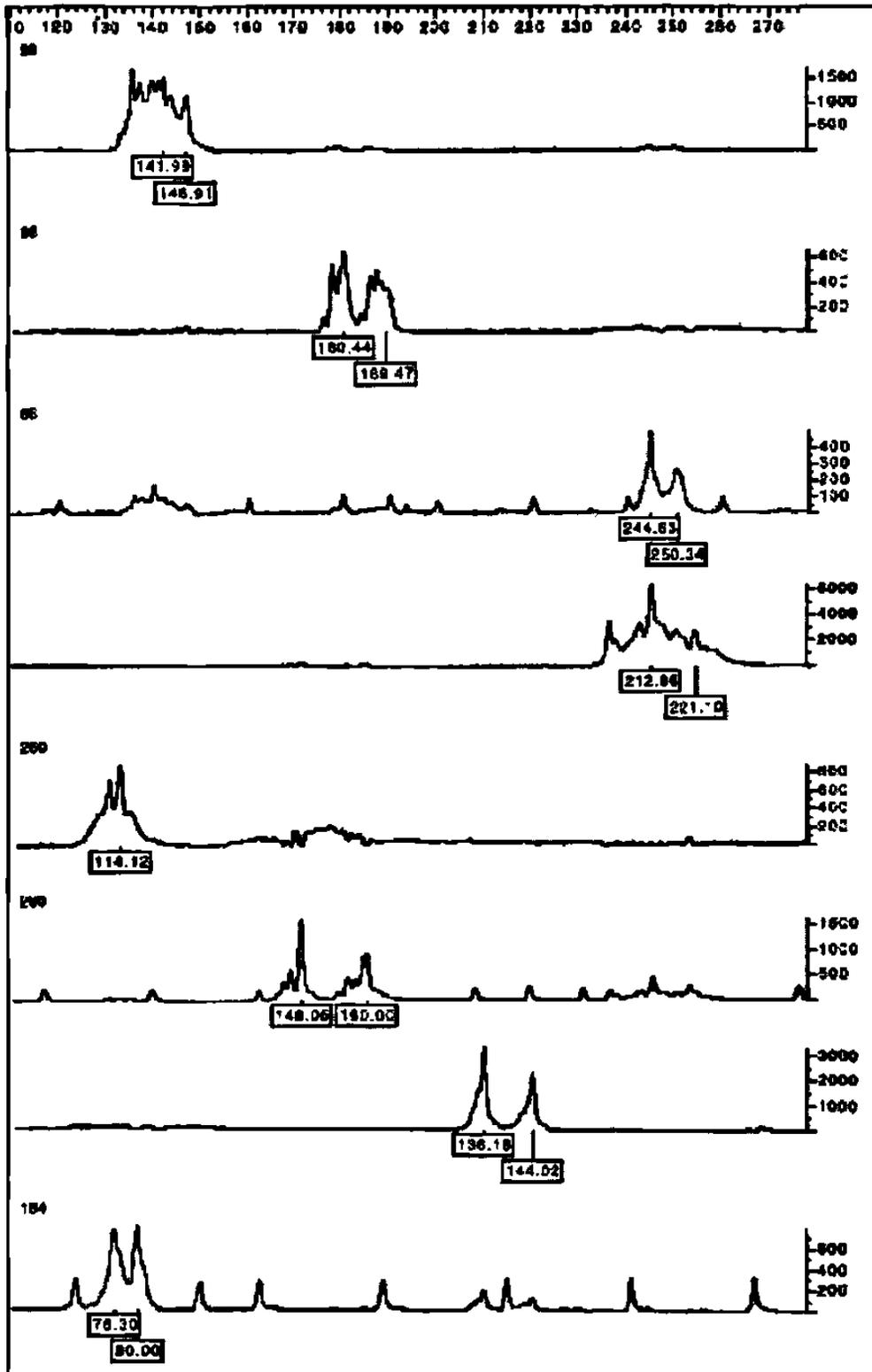


Figura 14 Apreciación de los STRs fluorescentes con el ABI. En la línea superior se muestra la señal del STR BM1824, consecutivamente y en orden descendente siguen las señales pertenecientes a los STRs BM2113, SPS115, ETH3, ETH10, ETH225 TGLA122 y TGLA227.

Tabla 12A. Alelos que conforman el genotipo de los animales del Ganado Suizo, estudiados.

PS,	BM1824	BM2113	SPS115	ETH3	ETH10	ETH225	TGLA122	TGLA227	SEX								
1PS_ENCH,	188	188	131	131	250	254	114	120	.	.	150	152	140	142	83	87	2
2PS_CARM,	180	188	138	144	250	254	112	114	.	.	148	148	1
3PS_SORU,	188	188	139	142	250	256	152	152	2
4PS_GARD,	180	182	137	140	250	252	146	157	2
5PS_HORM,	182	188	131	131	250	254	152	152	2
9PS_520C,	180	182	129	129	223	223	150	152	2
10PS_570,	178	182	129	131	250	254	152	152	2
11PS_TOR,	176	186	130	141	252	256	114	116	213	223	.	.	141	151	87	89	2
12PS_530,	176	186	130	141	252	256	114	114	215	223	148	153	141	153	76	87	2
13PS_590,	176	186	130	141	252	256	114	120	214	223	148	150	141	153	82	82	2
14PS_02C,	182	188	129	142	223	254	114	116	213	223	150	152	2
15PS_930,	180	186	128	141	250	256	2
16PS_670,	182	188	129	142	252	256	114	114	213	223	150	152	136	136	89	89	2
17PS_ARG,	188	188	129	142	252	256	114	116	213	223	142	150	142	150	87	93	2
18PS_720,	180	188	140	144	250	254	114	116	221	227	142	150	142	142	87	93	2
19PS_850,	176	186	130	141	252	256	114	117	221	221	142	150	142	150	87	93	2
20PS_CAR,	180	188	129	142	248	248	114	116	213	223	148	152	150	150	76	82	2
21PS_701,	180	188	129	145	240	254	114	116	215	221	148	152	150	150	76	82	2
22PS_820,	181	181	129	134	223	252	114	120	214	223	148	152	136	140	76	82	2
24PS_49C,	178	180	142	146	240	240	114	124	215	221	142	150	142	154	77	93	2
25PS_510,	179	180	142	146	250	254	114	114	215	221	142	150	141	141	77	93	2
26PS_600,	178	180	142	146	250	254	116	124	215	221	142	150	142	154	77	90	2
27PS_601,	178	180	142	146	250	254	114	124	215	221	142	150	150	154	77	93	2
28PS_650,	178	180	142	146	248	254	114	124	215	221	142	150	142	142	77	93	2
29PS_700,	178	180	142	146	243	250	114	124	215	221	142	150	142	154	77	93	2
44PS_906,	179	182	131	146	240	240	122	124	215	225	152	152	142	142	78	80	2
45PS_907,	182	188	131	146	243	243	112	114	221	227	152	152	142	142	78	80	2
49PS_980,	179	181	138	140	250	250	90	94	221	227	152	152	2
50PS_930,	178	180	129	146	243	250	90	94	215	225	146	148	150	150	94	94	2
51PS_41C,	178	178	129	129	243	250	114	114	221	227	146	148	152	159	77	83	2
52PS_970,	180	180	130	130	243	250	112	114	222	227	146	148	2
53PS_910,	179	179	129	129	243	250	114	114	221	225	146	148	150	152	77	83	2
54PS_960,	179	179	129	129	243	250	114	114	221	225	146	148	2
55PS_52C,	183	183	129	138	243	250	112	116	215	225	152	160	2
56PS_990,	182	182	129	137	243	250	112	116	215	225	152	160	2
82PS_H-3,	178	182	135	137	240	240	142	148	77	81	2
83PS_J-8,	180	182	137	137	243	250	150	150	89	97	2
84PS_J-4,	178	182	138	144	243	250	148	152	87	89	2
85PS_H-4,	178	182	138	142	243	250	142	175	89	93	2
86PS_J-4,	179	179	135	144	242	250	116	122	223	225	152	152	150	152	81	97	2
87PS_J-2,	178	178	135	144	250	254	2
88PS_J-2,	180	182	135	142	243	250	2
89PS_H-5,	178	182	129	138	250	254	2
90PS_H-3,	178	182	135	138	251	256	122	124	.	.	142	152	142	152	87	89	2
91PS_H-4,	178	182	135	137	250	256	140	150	81	81	2
92PS_J-2,	179	181	138	144	242	250	114	116	216	221	142	152	142	150	81	91	2
93PS_J-2,	179	182	131	144	250	256	122	122	218	223	148	152	152	175	89	93	2
94PS_H-2,	179	183	131	144	250	254	114	124	220	225	146	148	142	150	89	89	2
95PS_J-1,	182	182	138	146	250	260	114	122	219	223	146	152	140	142	89	97	2
96PS_257,	179	181	138	144	250	256	.	.	221	225	152	152	150	150	81	89	2
97PS_J-1,	179	182	135	135	240	250	116	122	221	225	148	152	2
98PS_J-3,	179	182	137	137	242	250	122	124	223	230	142	152	142	142	87	89	2
99PS_J-2,	181	181	138	138	250	250	122	122	221	225	142	152	2
100PS_J-,	181	181	137	137	243	250	122	124	223	225	142	152	142	142	87	87	2

*En la tabla 12 A aparece en la primer columna, la numeración en orden ascendente que se asignó para el control de los animales estudiados para efectos del análisis estadístico; la siguiente columna contiene la identificación que se le asignó a la extracción de ADN en el laboratorio; posteriormente aparece la identificación original de su arete o tatuaje dependiendo el caso de cada animal incluido en el análisis; después aparece cada uno de los microsatélites analizados por PCR múltiple (8) y su respectivo genotipo por animal.

Tabla 12B. Alelos que conforman el genotipo de los animales de la raza Beefmaster, estudiados.

BM,	BM1824	BM2113	SP6115	ETH3	ETH10	ETH225	TGLA122	TGLA227	SEX								
3BM_7038,	180	182	137	140	2								
4BM_7203,	188	188	137	140	2								
5BM_7250,	.	.	140	144	.	215	217	152	152	136	150	77	77	2			
7BM_7998,	182	182	138	140	.	112	118	2			
8BM_7023,	182	188	138	140	.	114	114	206	213	.	.	142	142	77	91	2	
9BM_7010,	182	188	137	140	2			
11BM_717,	180	186	127	136	250	258	118	118	209	215	152	152	141	149	78	78	1
13BM_727,	178	188	130	143	243	250	1
14BM_727,	.	.	127	130	1
15BM_728,	178	178	139	139	1
18BM_711,	180	186	136	139	1
19BM_715,	180	186	137	144	.	114	116	.	.	142	142	150	150	78	90	2	
20BM_711,	179	182	142	146	251	251	99	114	213	215	2
21BM_727,	180	182	129	144	.	101	118	.	.	150	160	142	150	76	78	2	
22BM_715,	180	189	142	147	245	250	100	118	215	218	156	156	150	150	82	82	2
23BM_715,	178	188	137	140	152	160	136	150	78	88	2
24BM_750,	.	.	142	146	243	248	114	118	215	217	152	152	142	150	77	91	2
25BM_728,	178	180	142	147	.	112	122	213	217	152	152	146	160	81	89	2	
26BM_726,	180	180	133	143	.	114	114	213	217	161	161	150	150	77	77	2	
27BM_700,	180	183	.	.	.	100	112	215	223	150	152	2	
28BM_726,	180	182	145	147	248	255	.	214	217	152	161	142	142	81	82	2	
29BM_715,	182	182	140	146	.	112	121	.	.	.	150	150	80	98	2		
30BM_772,	180	183	134	150	244	251	114	114	215	221	150	161	142	142	70	88	2
31BM_730,	180	182	140	148	.	112	122	213	215	146	160	136	140	80	88	2	
32BM_728,	.	.	137	149	.	.	.	217	217	2	
34BM_726,	181	182	147	147	.	.	213	217	142	161	142	150	77	99	2		
35BM_758,	.	.	137	137	245	251	.	217	217	152	152	2	
36BM_714,	180	180	129	133	.	100	114	.	.	.	150	150	82	88	2		
37BM_728,	182	188	129	144	.	112	114	211	218	152	152	136	146	90	98	2	
38BM_751,	188	188	142	146	251	262	.	217	221	156	161	140	142	80	80	2	
39BM_799,	183	189	135	138	240	247	.	213	213	152	152	140	142	98	98	2	
40BM_705,	183	189	131	135	243	250	2	
41BM_715,	183	188	139	139	242	249	100	114	2	
42BM_737,	183	188	132	133	243	250	99	114	213	215	2	
43BM_725,	180	182	133	146	250	262	2	
44BM_758,	180	188	142	142	248	250	2	
45BM_751,	182	182	133	133	250	256	2	
47BM_773,	182	182	140	142	248	262	2	
48BM_704,	178	182	133	138	250	262	114	115	.	.	.	142	142	78	80	2	
49BM_732,	182	182	129	144	248	258	2	
50BM_331,	180	188	137	140	250	256	2	
51BM_729,	182	188	133	146	250	262	2	
52BM_713,	182	182	133	142	250	262	2	
53BM_751,	182	182	133	135	248	250	2	
55BM_762,	180	182	137	140	.	116	116	213	213	160	160	150	150	88	98	1	
61BM_140,	182	188	133	146	.	122	124	.	.	150	152	150	152	82	88	1	
80BM_338,	180	182	.	.	.	101	114	210	217	2	
81BM_200,	182	182	.	.	.	112	122	2	
82BM_28/,	180	182	144	144	.	100	116	2	
84BM_28/,	179	182	2	
85BM_353,	182	188	131	144	2	
86BM_527,	180	188	129	146	1	
87BM_17/,	180	182	135	142	2	
88BM_018,	180	182	144	146	2	
89BM_132,	180	182	144	146	2	
91BM_112,	217	225	142	161	2	
92BM_41/,	217	221	150	152	2	
93BM_127,	114	116	216	216	150	156	2	
94BM_012,	223	226	161	161	2	

*Tabla 12 B aparece la misma descripción del pié de tabla de la 12 A.

4.7 Análisis de resultados

4.7.1 Número y frecuencia de alelos

En las tablas 13 (A y B) y 14 (A y B); se indican las frecuencias de cada marcador por raza, este resultado nos indica la relación del marcador entre el número de animales analizados y las veces que éste se repitió en cada raza. Además de que es un valor imprescindible para determinar la heterocigocidad y el PIC. El locus del STR BM1824 tuvo nueve alelos desde 176 hasta 188 pb (pares de bases) para BM y también nueve para PS desde 178 hasta 189 pb; el locus del STR BM2113 tuvo 15 alelos desde 128 hasta 146 pb para PS y 22 alelos desde 127 hasta 150 pb para BM; el locus del STR SPS115 tuvo 11 alelos desde 223 hasta 260 pb para PS y 14 alelos desde 240 hasta 262 pb para BM; el locus del STR ETH3 tuvo nueve alelos desde 90 hasta 124 pb para PS y 11 alelos desde 99 hasta 124 pb para BM; el locus del STR ETH10 tuvo 13 alelos desde 213 hasta 230 pb para PS y 14 alelos desde 206 hasta 226 pb para BM; el locus del STR ETH225 tuvo ocho alelos desde 142 hasta 160 pb para PS y ocho alelos desde 142 hasta 161 pb para PS; el locus del STR TGLA122 tuvo siete alelos desde 136 hasta 154 pb para PS y cinco alelos desde 136 hasta 150 pb para BM y por último el locus del MS TGLA227 tuvo 10 alelos desde 76 hasta 94 pb para PS y siete alelos desde 76 hasta 98 pb para BM.

El número y frecuencia de alelos encontrados fueron muy informativos. El STR con menos alelos tuvo ocho y el STR con más alelos tuvo 22. Esto indica que son STRs con polimorfismo adecuado para una población de animales de este tipo de explotación. En las frecuencias de cada alelo hubo muy poca variabilidad del equilibrio de HW. El equilibrio de HW se da en poblaciones con mucha diversidad genética (Devlin y Risch, 1992), lo que no sucede con las poblaciones de bovinos, por eso encontramos que las frecuencias de los alelos son muy similares o bien que el genotipo dado por un STR es muy frecuente, por eso este equilibrio no explica éste estudio.

Tabla 13, A y B. Locus (alelo) de cada STR, R (número observado) y pi (frecuencia génica) de cada alelo en la raza PS.

A

Locus M1	R	pi	Locus M2	R	pi	Locus M3	R	pi	Locus M4	R	pi
176	4	0.0370	128	1	0.0093	223	4	0.0370	90	2	0.0256
178	17	0.1574	129	19	0.1759	240	8	0.0741	94	2	0.0256
179	15	0.1388	130	6	0.0556	242	3	0.0278	112	5	0.0641
180	18	0.1666	131	9	0.0833	243	15	0.1389	114	32	0.4103
181	9	0.0833	134	1	0.0093	248	3	0.0278	116	12	0.1539
182	23	0.2129	135	8	0.0741	250	39	0.3611	117	1	0.0128
183	3	0.0277	137	10	0.0926	251	1	0.0093	120	3	0.0385
186	5	0.0463	138	12	0.1111	252	8	0.0741	122	11	0.1410
188	14	0.1296	139	1	0.0093	254	14	0.1296	124	10	0.1282
			140	3	0.0278	256	12	0.1111			
			141	5	0.0463	260	1	0.0093			
			142	13	0.1204						
			144	9	0.0833						
			145	1	0.0093						
			146	10	0.0926						

B

Locus M5	R	pi	Locus M6	R	pi	Locus M7	R	pi	Locus M8	R	pi
213	5	0.0676	142	14	0.1591	136	3	0.0417	76	4	0.0556
214	2	0.0270	146	8	0.0909	140	4	0.0556	77	9	0.1250
215	12	0.1622	148	15	0.1704	141	5	0.0694	78	2	0.0278
216	1	0.0135	150	14	0.1591	142	24	0.3333	80	2	0.0278
218	1	0.0135	152	33	0.3750	148	2	0.0278	81	6	0.0833
219	1	0.0135	153	1	0.0114	150	18	0.2500	82	5	0.0694
220	1	0.0135	157	1	0.0114	151	1	0.0139	83	3	0.0417
221	19	0.2568	160	2	0.0227	152	6	0.0833	87	11	0.1528
222	1	0.0135				153	2	0.0278	89	13	0.1806
223	13	0.1757				154	4	0.0556	90	1	0.0139
225	12	0.1622				159	1	0.0139	91	1	0.0139
227	5	0.0676				175	2	0.0278	93	10	0.1389
230	1	0.0135							94	2	0.0278
									97	3	0.0417

*En esta tabla los microsatélites se abreviaron de la siguiente manera M1 (BM1824), M2 (BM2113), M3 (SPS115), M4 (ETH3), M5 (ETH10), M6 (ETH225), M7 (TGLA122) y M8 (TGLA227). También se encuentra incluido el tamaño de cada alelo en el locus del marcador (180, 182, 188, etc.)

Tabla 14, A y B. Locus (alelo) de cada STR, R (número observado) y pi (frecuencia génica) de cada alelo en la raza BM.

A

Locus M1	R	pi	Locus M2	R	pi	Locus M3	R	pi	Locus M4	R	pi
178	6	0.0600	127	2	0.0196	240	1	0.0217	99	2	0.0400
179	2	0.0200	129	5	0.0490	242	1	0.0217	100	5	0.1000
180	25	0.2500	130	2	0.0196	243	4	0.0870	101	2	0.0400
181	1	0.0100	131	2	0.0196	244	1	0.0217	112	7	0.1400
182	37	0.3700	132	1	0.0098	245	2	0.0435	114	16	0.3200
183	6	0.0600	133	11	0.1078	247	1	0.0217	115	1	0.0200
186	3	0.0300	134	1	0.0098	248	6	0.1304	116	5	0.1000
188	17	0.1700	135	4	0.0392	249	1	0.0217	118	6	0.1200
189	3	0.0300	136	2	0.0196	250	13	0.2826	121	1	0.0200
			137	10	0.0980	251	5	0.1087	122	4	0.0800
			138	4	0.0392	255	1	0.0217	124	1	0.0200
			139	5	0.0490	256	2	0.0435			
			140	12	0.1177	258	2	0.0435			
			142	10	0.0980	262	6	0.1304			
			143	2	0.0196						
			144	10	0.0980						
			145	1	0.0098						
			146	10	0.0980						
			147	5	0.0490						
			148	1	0.0098						
			149	1	0.0098						
			150	1	0.0098						

B

Locus M5	R	pi	Locus M6	R	pi	Locus M7	R	pi	Locus M8	R	pi
206	1	0.0200	142	4	0.0833	136	4	0.0909	70	1	0.0227
209	1	0.0200	146	1	0.0208	140	3	0.0682	76	1	0.0227
210	1	0.0200	150	6	0.1250	141	1	0.0227	77	7	0.1591
211	1	0.0200	152	19	0.3958	142	13	0.2954	78	6	0.1364
213	11	0.2200	156	4	0.0833	146	2	0.0454	80	5	0.1136
214	1	0.0200	160	5	0.1042	149	1	0.0227	81	2	0.0454
215	9	0.1800	161	9	0.1875	150	18	0.4091	82	5	0.1136
216	2	0.0400				152	1	0.0227	88	6	0.1364
217	14	0.2800				160	1	0.0227	89	1	0.0227
218	2	0.0400							90	2	0.0454
221	3	0.0600							91	2	0.0454
223	2	0.0400							98	5	0.1136
225	1	0.0200							99	1	0.0227
226	1	0.0200									

*En esta tabla los microsatélites se abreviaron de la siguiente manera M1 (BM1824), M2 (BM2113), M3 (SPS115), M4 (ETH3), M5 (ETH10), M6 (ETH225), M7 (TGLA122) y M8 (TGLA227). También se encuentra incluido el tamaño de cada alelo en el locus del marcador (190, 182, 188, etc.)

4.7.2 Frecuencia genotípica

Los diferentes genotipos encontrados, fueron muy informativos y sus frecuencias muy cercanas. Para el STR BM1824 se encontraron en el Ganado Suizo 18 genotipos diferentes con frecuencias desde 0.0185 hasta 0.1296 y en la raza Beefmaster 17 genotipos con frecuencias desde 0.02 hasta 0.22. El STR BM2113, tuvo 31 genotipos con frecuencias desde 0.0185 hasta 0.1111 para el Ganado Suizo y para la raza Beefmaster tuvo 36 genotipos con frecuencias desde 0.0196 hasta 0.1176. El STR SPS115, tuvo 18 genotipos con frecuencias desde 0.0185 hasta 0.2407 para el Ganado Suizo y 16 genotipos con frecuencias desde 0.0435 hasta 0.1739, para la Beefmaster. El ETH3, tuvo 13 genotipos con frecuencias desde 0.0256 hasta 0.1795 para el Ganado Suizo y 18 genotipos con frecuencias desde 0.04 hasta 0.12 para la Beefmaster. El ETH10, tuvo 15 genotipos con frecuencias desde 0.0270 hasta 0.1892, para el Ganado Suizo y 14 genotipos con frecuencias desde 0.02 hasta 0.28, para la Beefmaster. El ETH225, tuvo 12 genotipos con frecuencias desde 0.0227 hasta 0.2045, para el Ganado Suizo y 14 genotipos con frecuencias desde 0.0417 hasta 0.2917, para la Beefmaster. El TGLA122, tuvo 19 genotipos con frecuencias desde 0.0278 hasta 0.1667, para el Ganado Suizo y 10 genotipos con frecuencias desde 0.0455 hasta 0.2727, para la Beefmaster. El TGLA227, tuvo 20 genotipos con frecuencias desde 0.0278 hasta 0.1389, para el Ganado Suizo y 19 genotipos con frecuencias desde 0.0455 hasta 0.0909, para la Beefmaster (Tablas 14 A y B).

Tabla 15A. Genotipos y frecuencia de los ocho STRs para el Ganado Suizo.

M1		M2		M3		M4	
Genotipo observado	PI						
176/186	0.0741	128/141	0.0185	223/223	0.0185	90/94	0.0513
178/178	0.0370	129/129	0.0741	223/252	0.0185	112/114	0.0796
178/180	0.1111	129/131	0.0185	223/254	0.0185	112/116	0.0513
178/182	0.1296	129/134	0.0185	240/240	0.0556	114/114	0.1538
179/179	0.0556	129/137	0.0185	240/250	0.0185	114/116	0.1795
179/180	0.0185	129/138	0.0370	240/254	0.0185	114/117	0.0256
179/181	0.0556	129/142	0.0741	242/250	0.0556	114/120	0.0769
179/182	0.0741	129/145	0.0185	243/243	0.0185	114/122	0.0256
179/183	0.0185	129/146	0.0185	243/250	0.2407	114/124	0.1282
180/180	0.0185	130/130	0.0185	248/248	0.0185	116/122	0.0513
180/182	0.0741	130/141	0.0741	248/254	0.0185	116/124	0.0256
180/186	0.0185	131/131	0.0370	250/250	0.0370	122/122	0.0513
180/188	0.0741	131/144	0.0370	250/252	0.0185	122/124	0.1026
181/181	0.0556	131/146	0.0370	250/254	0.2037		
182/182	0.0370	135/145	0.0185	250/256	0.0926		
182/188	0.0741	135/137	0.0370	250/260	0.0185		
183/183	0.0185	135/138	0.0185	251/256	0.0185		
188/188	0.0556	135/142	0.0185	252/256	0.1111		
		135/144	0.0370				
		137/137	0.0556				
		137/140	0.0185				
		138/138	0.0185				
		138/140	0.0185				
		138/142	0.0185				
		138/144	0.0741				
		138/146	0.0185				
		138/142	0.0185				
		140/144	0.0185				
		142/146	0.1111				
		142/142	0.0196				
		142/146	0.0588				
M5		M6		M7		M8	
Genotipo observado	PI						
213/223	0.1351	142/150	0.2045	136/136	0.0278	76/82	0.0833
214/223	0.0541	142/152	0.1136	136/140	0.0278	76/87	0.0278
215/221	0.1892	146/148	0.1364	140/142	0.0556	77/81	0.0278
215/223	0.0270	146/152	0.0227	140/150	0.0278	77/83	0.0556
215/225	0.1081	146/157	0.0227	141/141	0.0278	77/80	0.0278
216/221	0.0270	148/148	0.0227	141/151	0.0278	77/83	0.1389
218/223	0.0270	148/150	0.0227	141/153	0.0556	78/80	0.0556
219/223	0.0270	148/152	0.1136	142/142	0.1667	81/81	0.0278
220/225	0.0270	148/153	0.0227	142/148	0.0278	81/89	0.0278
221/221	0.0270	150/152	0.0909	142/150	0.1111	81/91	0.0278
221/225	0.1351	152/152	0.1818	142/152	0.0278	81/97	0.0278
221/227	0.1081	152/160	0.0455	142/154	0.0833	82/82	0.0278
222/227	0.0270			142/175	0.0278	83/87	0.0278
223/225	0.0541			148/152	0.0278	87/87	0.0278
223/230	0.0270			150/150	0.1389	87/89	0.1111
				150/152	0.0556	87/93	0.0833
				150/154	0.0278	89/89	0.0556
				152/159	0.0278	89/93	0.0556
				152/175	0.0278	89/97	0.0556
						94/94	0.0278

Tabla 15B. Genotipos y frecuencia de los ocho STRs para la raza Beefmaster.

M1		M2		M3		M4	
Genotipo observado	PI	Genotipo observado	PI	Genotipo observado	PI	Genotipo observado	PI
178/178	0.02	127/130	0.0196	240/247	0.0435	99/114	0.060
178/180	0.02	127/136	0.0196	242/249	0.0435	100/112	0.040
178/182	0.02	129/133	0.0196	243/248	0.0435	100/114	0.060
178/188	0.04	129/144	0.0588	243/250	0.1304	100/116	0.040
179/182	0.04	129/146	0.0196	244/251	0.0435	100/118	0.040
180/180	0.04	130/143	0.0196	245/250	0.0435	101/114	0.040
180/182	0.22	131/135	0.0196	245/251	0.0435	101/118	0.040
180/183	0.04	131/144	0.0196	248/250	0.0870	112/114	0.040
180/186	0.06	132/133	0.0196	248/255	0.0435	112/118	0.040
180/188	0.06	133/133	0.0196	248/258	0.0435	112/121	0.040
180/189	0.02	133/135	0.0196	248/262	0.0435	112/122	0.120
181/182	0.02	133/138	0.0196	250/256	0.0870	114/114	0.120
182/182	0.16	133/142	0.0196	250/258	0.0435	114/115	0.040
182/188	0.12	133/143	0.0196	250/262	0.1739	114/116	0.060
183/188	0.04	133/146	0.0588	251/251	0.0435	114/118	0.040
183/189	0.04	134/150	0.0196	251/262	0.0435	116/118	0.040
188/188	0.04	135/138	0.0196			118/118	0.040
		135/142	0.0196			122/124	0.040
		136/139	0.0196				
		137/137	0.0196				
		137/140	0.1176				
		137/144	0.0196				
		137/149	0.0196				
		138/140	0.0392				
		139/139	0.0392				
		140/142	0.0196				
		140/144	0.0196				
		140/146	0.0196				
		140/148	0.0196				
		142/142	0.0196				
		142/146	0.0588				
		142/147	0.0392				
		144/144	0.0196				
		144/146	0.0392				
		145/147	0.0196				
		147/147	0.0196				
M5		M6		M7		M8	
Genotipo observado	PI	Genotipo observado	PI	Genotipo observado	PI	Genotipo observado	PI
206/213	0.040	142/142	0.0417	136/140	0.0455	70/88	0.0455
209/215	0.040	142/161	0.0833	136/148	0.0455	76/78	0.0455
210/217	0.040	148/160	0.0417	136/150	0.0909	77/77	0.0909
211/218	0.040	150/152	0.1250	140/142	0.0909	77/91	0.0909
213/213	0.080	150/156	0.0417	141/149	0.0455	77/99	0.0455
213/215	0.120	150/160	0.0417	142/142	0.1818	78/78	0.0455
213/217	0.120	150/161	0.0417	142/150	0.1364	78/80	0.0455
214/217	0.040	152/152	0.2917	146/160	0.0455	78/88	0.0455
215/217	0.080	152/160	0.0417	150/150	0.2727	78/90	0.0455
215/218	0.040	152/161	0.0417	150/152	0.0455	80/80	0.0455
215/221	0.040	156/156	0.0417			80/88	0.0455
215/223	0.040	156/161	0.0417			80/98	0.0455
216/216	0.040	160/160	0.0417			81/82	0.0455
217/217	0.080	161/161	0.0833			81/89	0.0455
217/221	0.080					82/82	0.0909
217/225	0.040					82/88	0.0455
223/226	0.040					88/98	0.0455
						90/98	0.0455
						98/98	0.0455

4.7.3 PIC y Heterocigocidad

La información proporcionada por el PIC y la heterocigocidad, indica que los ocho microsatélites estudiados son altamente polimórficos tanto para Beefmaster como para Ganado Suizo. Estos STRs desde el 1 hasta el 8 tuvieron los siguientes valores de PIC y heterocigocidad respectivamente: M1, 1 y 0.6921 para PS y 1 y 0.7470 para BM; M2, 1 y 0.8245 para PS y 1 y 0.8811 para BM; M3, 1 y 0.7191 para PS y 1 y 0.8582 para BM; M4, 0.998 y 0.7646 para PS y 0.999 y 0.8238 para BM; M5, 1 y 0.8397 para PS y 1 y 0.7892 para BM; M6, 0.998 y 0.7707 para PS y 0.998 y 0.5887 para BM; M7, 0.999 y 0.7260 para PS y 0.997 y 0.7031 para BM y el último marcador M8, 1 y 0.8083 para PS y 0.999 y 0.8121 para BM. El PIC calculado en los 8 marcadores estuvo entre 0.998 y 1, lo cual les da un valor muy deseable en cuanto polimorfismo y por lo tanto los hace útiles para identificación de paternidad (tabla 16).

Tabla 16. Contenido de Información Polimórfica (PIC), heterocigocidad (H) y cantidad de alelos de los STRs BM1824, BM2113, SPS115 y ETH3.

	Ganado Suizo					Beefmaster				
	N	Alelos	Genotipos	PIC	H	N	Alelos	Genotipos	PIC	H
BM1824	54	9	18	1	0.6921	50	9	17	1	0.7470
BM2113	54	15	29	1	0.8245	51	22	22	1	0.8811
SPS115	54	11	18	1	0.7191	23	14	16	1	0.8582
ETH3	39	9	13	0.998	0.7646	25	11	18	0.999	0.8238
ETH10	37	13	15	1	0.8397	25	14	17	1	0.7892
ETH225	44	8	12	0.998	0.7707	24	8	14	0.998	0.5887
TGLA122	36	12	19	1	0.7260	22	9	10	1	0.7031
TGLA227	36	14	20	1	0.8083	22	13	19	1	0.8121

*El PIC y la heterocigocidad de cada STR aparecen junto con la N (perteneciente al número de animales analizados), el número de alelos y la raza.

4.7.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Una vez hecho el análisis de frecuencias alélicas y genotípicas, por cada uno de los ocho STRs analizados para el Ganado Suizo y la raza Beefmaster; se realizaron: 1) la prueba de homocigocidad, 2) la prueba de razón de verosimilitud y 3) la prueba exacta, con el propósito de determinar si cada uno de los STRs se encontraba en equilibrio de HW. En los animales de Ganado Suizo se encontraron los siguientes resultados en lo referente a equilibrio de HW; las tres pruebas realizadas a las frecuencias de los STRs BM1824, BM 2113, ETH10, TGLA122 y TGLA227, tuvieron valores < 0.05 , por lo que se consideran en desequilibrio; mientras que el SPS115, ETH3 y ETH225, tuvieron valores > 0.05 en al menos una de las pruebas (prueba de homocigocidad), por lo que se consideran en equilibrio. En los animales de la raza Beefmaster se encontraron los siguientes resultados en lo referente a equilibrio de HW; las tres pruebas realizadas a las frecuencias de los STRs ETH225 y TGLA122, tuvieron valores < 0.05 , por lo que se consideran en desequilibrio; por otra parte el BM1824, SPS115, ETH3 y ETH10, tuvieron valores > 0.05 en las tres pruebas; mientras que el BM2113 y el TGLA227 tuvieron valores > 0.05 en al menos una de las pruebas (prueba de homocigocidad y prueba de LRT, respectivamente), por lo que estos últimos 6 STRs se consideran en equilibrio de HW (Tabla 16 A y B).

4.7.5 Poder de discriminación y probabilidad de exclusión

El poder de discriminación (PD) fue determinado a partir de las frecuencias genotípicas, mediante la suma de todas las combinaciones encontrados entre todos los alelos por STR. El PD fue determinado a partir de las frecuencias genotípicas y se encontró que el PD de los STRs analizados tuvo valores desde 0.8678 hasta 0.9486, para la raza de Ganado Suizo y desde 0.8471 hasta 0.9589, para Beefmaster. La probabilidad de exclusión (PE) fue determinada a partir de las frecuencias alélicas y se encontró que la PE de los STRs analizados tuvo valores desde 0.5690 hasta 0.7966, para el Ganado Suizo y desde 0.5570 hasta 0.9187, para la Beefmaster. También se hizo un análisis combinado del PD y la PE, con esto se obtuvo para ambas razas un PD combinado de 1 y una PE combinada de 0.9998 para el Ganado Suizo y de 0.9999 para Beefmaster (Tablas 16 A y B).

Tabla 17A. Pruebas de equilibrio de HW para los loci BM1824, BM2113, SPS115 y ETH3.

Loci	Ganado Suizo	Beefmaster
BM1824	N= 54	N= 50
Homocigocidad Observada	13.72%	23.01%
Homocigocidad Esperada	27.78%	26.00%
Prueba de Homocigocidad	0.00450	0.71950
Prueba LRT	0.00000	0.08950
Prueba Exacta	0.00000	0.10200
Poder de Discusión	0.9266	0.8912
Poder de Exclusión	0.7075	0.5570
BM2113	N= 54	N= 51
Homocigocidad Observada	9.22%	6.76%
Homocigocidad Esperada	22.22%	13.73%
Prueba de Homocigocidad	0.0150	0.05400
Prueba LRT	0.00000	0.00000
Prueba Exacta	0.00000	0.00000
Poder de Discusión	0.9486	0.9589
Poder de Exclusión	0.7966	0.9187
SPS115	N= 54	N= 23
Homocigocidad Observada	18.54%	12.27%
Homocigocidad Esperada	14.81%	4.35%
Prueba de Homocigocidad	0.44900	0.30900
Prueba LRT	0.00000	0.08400
Prueba Exacta	0.00000	0.19700
Poder de Discusión	0.8683	0.9149
Poder de Exclusión	0.6424	0.7266
ETH3	N= 39	N= 25
Homocigocidad Observada	22.54%	15.02%
Homocigocidad Esperada	20.51%	20.00%
Prueba de Homocigocidad	0.82850	0.52750
Prueba LRT	0.00700	0.52550
Prueba Exacta	0.03300	0.43000
Poder de Discusión	0.8928	0.9312
Poder de Exclusión	0.5752	0.6819

La homocigocidad esperada es un estimador insesgado; la prueba de homocigocidad, la prueba LRT (prueba de razón de verosimilitud) y la prueba exacta, son valores probabilísticos.

Tabla 17B. Pruebas de equilibrio de HW para los loci ETH10, ETH225, TGLA122 y TGLA227.

Loci	Ganado Suizo	Beefmaster
ETH10	N= 37	N= 25
Homocigocidad Observada	14.88%	15.35%
Homocigocidad Esperada	2.70%	20.00%
Prueba de Homocigocidad	0.02900	0.57300
Prueba LRT	0.00000	0.36300
Prueba Exacta	0.00000	0.36900
Poder de Discusión	0.8926	0.9280
Poder de Exclusión	0.6835	0.6717
ETH225	N= 44	N= 24
Homocigocidad Observada	22.05%	21.63%
Homocigocidad Esperada	20.45%	50.00%
Prueba de Homocigocidad	0.85000	0.00050
Prueba LRT	0.00000	0.01400
Prueba Exacta	0.00000	0.00200
Poder de Discusión	0.8678	0.8680
Poder de Exclusión	0.5690	0.5727
TGLA122	N= 36	N= 22
Homocigocidad Observada	18.47%	25.48%
Homocigocidad Esperada	36.11%	45.45%
Prueba de Homocigocidad	0.00500	0.02450
Prueba LRT	0.00950	0.00750
Prueba Exacta	0.00500	0.00550
Poder de Discusión	0.9151	0.8471
Poder de Exclusión	0.6345	0.6253
TGLA227	N= 36	N= 22
Homocigocidad Observada	9.94%	8.88%
Homocigocidad Esperada	16.67%	27.27%
Prueba de Homocigocidad	0.26050	0.00550
Prueba LRT	0.00000	0.11300
Prueba Exacta	0.00000	0.03350
Poder de Discusión	0.9305	0.9421
Poder de Exclusión	0.7753	0.7783

*La homocigocidad esperada es un estimador insesgado; la prueba de homocigocidad, la prueba LRT (prueba de razón de verosimilitud) y la prueba exacta, son valores probabilísticos.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio, fue determinar las frecuencias alélicas y heterocigocidad de un panel de ocho STRs en 59 bovinos Beefmaster y 54 bovinos de Ganado Suizo. Al principio eran nueve STRs, pero durante la estandarización del análisis de cada STR, se obtuvo como parte de los resultados que uno de los STRs estaba dañado de origen y se decidió realizar todo el análisis solo con los ocho STRs en buenas condiciones.

Las extracciones de ADN que se utilizaron en el análisis de los STRs en este trabajo, fueron realizadas con el método de DESALADO. El primer factor tomado en cuenta fue el tiempo de almacenaje de la muestra, ya que el muestreo se realizó desde el inicio de la investigación en enero de 1999. En el transcurso de los dos años que duró el trabajo de laboratorio, este método resultó ser el más eficiente para realizar extracciones a muestras de sangre con dos años de almacenamiento. Otro factor en la selección de este método fue que las soluciones de trabajo se pueden preparar con reactivos de uso común en el laboratorio; por último, la selección responde también a que es el método que cita la mayoría de artículos científicos consultados para la realización de esta tesis.

La concentración de los STRs, para realizar PCR individual y en mezcla, amplificó con la misma concentración de cada iniciador para ambos, PCR simple y múltiple. Pero los requerimientos de las concentraciones de ADN, Mg y dNTPs, en el PCR individual, tuvieron que ser incrementados para el PCR múltiple.

En el secuenciador automático (departamento de patobiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Texas A&M) se obtuvo el tamaño exacto de cada alelo; de este mismo departamento, algunos resultados llegaron sin información, a pesar de que en la verificación en agarosa al 2% hubieran resultado positivos. Uno de los factores que pudo haber influido fue la cantidad y calidad de ADN utilizada en el PCR. Ya que las muestras procesadas con ADN recién extraído salieron con menos resultados negativos en comparación con las que tenían más tiempo de almacenamiento.

El polimorfismo de los STRs es evidente ya que fueron encontrados un gran número de alelos en todos los loci determinados en este estudio, esto no es un valor importante para explicar una población en desequilibrio de HW, pero sí para su uso en probabilidades de exclusión. Ya que los ocho STRs muestran un alto polimorfismo, esto indica un resultado muy valioso para la verificación de la paternidad de la raza Beefmaster y el Ganado Suizo.

En 1993 Steffen *et al* encontró solo seis alelos para el ETH225 en bovinos de producción lechera. En 1998 Mommens *et al.*, analizaron un panel de 33 STRs en el Bison Americano y el *Bison bison*. Dentro de los 33 STRs analizados se encuentran los ocho analizados en el presente trabajo. En esta especie de animales rumiantes el ETH3 y ETH225 tuvieron solo tres alelos mientras que los bovinos de este estudio tuvieron 15 alelos para el ETH3 y 10 alelos para el ETH225 en un grupo de 54 y 59 animales de Ganado Suizo y Beefmaster, respectivamente; este dato es solo un ejemplo ya que el resto de STRs comparativamente tuvieron el mismo comportamiento.

Otro estudio realizado por van Hooft *et al.* en 1999 incluyó tres de los STRs analizados por nosotros para determinar su presencia en el Búfalo Africano; el TGLA122, no estuvo presente mientras que el TGLA227 tuvo dos alelos y el BM2113 tuvo cuatro alelos; en nuestro estudio estos mismo STRs tuvieron en conjunto 24 alelos para el BM2113, 15 para el TGLA122 y 18 alelos para el TGLA227.

En lo que refiere al equilibrio de HW, en este estudio se apreció una evidente desviación, lo que concuerda con Usha *et al.* que en 1995, utilizaron 14 razas y cinco STRs, para un estudio similar, de lo que cuatro razas se encontraron en equilibrio y el resto en desequilibrio para los cinco marcadores analizados por ellos. Mientras que en este trabajo, en el Ganado Suizo se encontraron cinco STRs en desequilibrio y tres en equilibrio; y para la Beefmaster dos se encontraron en desequilibrio y los otros seis en equilibrio.

De acuerdo con los objetivos de este trabajo, no existe problema ya que no se buscó establecer que los alelos se encuentren en equilibrio de HW, además de que este tipo de equilibrio se aplica a poblaciones abiertas y no seleccionadas como en el presente estudio.

Este desequilibrio es esperado ya que se analizaron pocos animales procedentes de tres hatos, de haber analizado el mismo número de animales procedentes del mismo número de hatos (un animal de cada hato), entonces se esperaría equilibrio de HW. Sin embargo, aún bajo estas condiciones para realizar pruebas de paternidad se debe considerar el pedigrí de cada animal para saber si existen ancestros comunes, lo cual es muy probable en explotaciones bovinas (<http://marc.usa.gov>).

Debido a lo anterior en este trabajo, el equilibrio HW no se utiliza, principalmente por el número limitado de animales y procedencia; además de que estas razas han estado expuestas a selección y migración.

Eduardo Casas, genetista investigador del U. S. Meat Animal Research Center (comunicación personal, <http://marc.usa.gov>) comenta que aún sin equilibrio de HW se pueden utilizar STRs para establecer probabilidades de exclusión y que entre más emparentados estén los padres de las crías, mayor número de STRs se debe utilizar para establecer una alta probabilidad de exclusión o baja según el punto de vista. En el U. S. Meat Animal Research Center, utilizan 12 marcadores, los cuales dan un 99.9% de probabilidad de exclusión, en hatos conformados por potreros de 120 vacas y seis a ocho sementales en donde algunos sementales son medios hermanos. En estos hatos con los 12 STRs se excluye con confianza para saber quien es el padre de la cría.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

La cantidad de muestras de sangre y su respectiva extracción de ADN obtenidas (150 ganado Beefmaster y 180 ganado suizo) fue representativa, en este trabajo se utilizó un tamaño de muestra para el análisis de los STRs menor por los recursos del proyecto existentes. Este tamaño de muestra no es representativo para hacer estudios poblacionales a éstas razas que involucren el equilibrio de Hardy-Weinberg, como lo son estudios de diversidad genética, evolutivos y de clasificación filogenética o variedades de una misma raza y especie. Ya que para ese tipo de estudios se requiere de un tamaño de muestra de 250 animales provenientes de diferentes áreas de distribución geográfica.

Se decidió utilizar el método de extracción de ADN DESALADO, por que fue el que mejor se adaptó a las necesidades en el laboratorio. Las soluciones de trabajo de éste método se preparan en el laboratorio con sales comunes, la incubación, es uno de los inconvenientes debido al tiempo de espera que es de 2 1/2 horas aproximadamente y el reactivo para realizarla (proteinasas K) es lo más caro de los reactivos que utiliza el método DESALADO. Por encima de éstos 2 inconvenientes resultó ser el más satisfactorio por lo fácil de preparar las soluciones de trabajo y la calidad del ADN obtenida.

La ventaja que representó el utilizar marcadores fluorescentes en los STRs, se debe principalmente al manejo de bromuro de etidio en la UBA.

De la amplificación en mezcla comparada con la amplificación individual de STRs, hubo variaciones ya que para amplificar los iniciadores en mezcla se necesitó más cantidad de ADN ($5\mu\text{l}=100\text{ng}$) que para la amplificación individual ($1\mu\text{l}=20\text{ng}$). La concentración de Mg también tuvo variaciones, ya que para amplificar la mezcla de iniciadores se requirió el Mg a una concentración de 2.5mM dentro del buffer de acción de la taq polimerasa y para la amplificación individual de los STRs se requirió Mg a una concentración de $2.0\mu\text{M}$. La temperatura de alineamiento fue un factor muy importante para amplificación sobre todo para la posterior amplificación en mezcla de grupos de tres STRs.

El resto de reactivos que se utilizaron para la PCR se requirieron igual tanto para la amplificación individual como para la amplificación en mezcla, y esto fue siguiendo las indicaciones de la compañía comercial.

Los resultados con el secuenciador automático fueron inestables ya que algunos llegaron sin información, y éstos coincidieron con las muestras de PCR procesadas con las extracciones de ADN que tenían más tiempo de almacenamiento.

Todos los STRs analizados resultaron ser altamente polimórficos, en las razas de ganado bovino Pardo Suizo y Beefmaster en México; este es un resultado muy informativo para los STRs que se necesitan para el análisis de paternidad.

En cuanto a las frecuencias alélicas, resultaron con valores de entre 0.009 y 0.39 en todos los STRs, lo que en las tablas 14A y 14B se ve reflejado en el genotipo de cada animal, pues resulta muy repetida la misma combinación de alelos, cuando comparamos un solo STR.

Este resultado se relaciona con el equilibrio de HW (Tablas 16 A y B) encontrado pues el resultado fue variable; lo que se explica si tomamos en cuenta que el equilibrio de HW, se aplica a poblaciones abiertas (sin selección).

Por eso para la pruebas de paternidad en bovinos en este estudio, no es relevante el equilibrio de HW, principalmente por el origen y tamaño de la muestra y también por el tipo de especie animal, ya que los bovinos y estas razas en particular no están sujetas a la selección natural del vigor híbrido y la migración, como sucede en las especies silvestres o incluso la población humana (dependiendo de la cultura social y religiosa, que rige cada etnia).

La PE de cada STR, para cada raza estudiada, tuvo valores por debajo de 0.7966, esto no significa que la información que aporta cada STR haya resultado insuficiente para el diagnóstico de paternidad, porque la PE se eleva al incrementar el panel de STRs analizados, ya que también se incrementan las posibles combinaciones de los alelos en la conformación total del genotipo dada por los ocho STRs.

La Probabilidad de Exclusión combinada de los ocho STRs, es adecuada para establecer un diagnóstico de paternidad certero y confiable para cada raza, sin tomar en cuenta el equilibrio de HW.

Pero si se quiere utilizar este parámetro para otros efectos como diversidad genética o estudios filogenéticos, entonces se debe hacer un análisis más amplio fundamentado en un muestreo de 150 animales como mínimo provenientes de un número similar de hatos (Chakraborty, 1999).

Por eso para mejorar este estudio y ofrecer un diagnóstico ético en un caso de disputa de paternidad, se recomienda aumentar la cantidad de animales y STRs analizados. Este trabajo también deja todas las condiciones necesarias para hacer una escalera alélica de cada STR para los bovinos de Ganado Suizo y Beefmaster de México.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Amarante M. R., Yang Y. P., Kata S. R., Lopes C. R., Womack, J. E. 2000. RH maps of bovine chromosomes 15 and 29: conservation of human chromosomes 11 and 5. Mammalian Genome. 11(5):364.8.**
- Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Beefmaster. 2001. Información sobre el origen y situación productiva del ganado Beefmaster. Ubicación: Juárez #940 oriente, Guadalupe, Nuevo León, Código Postal 67150, teléfonos 83371938 y 83371939.**
- Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Suizo. 2001. Información sobre el origen y situación productiva del Ganado Suizo. Ubicación: Andalucía #162, colonia los Álamos, Código Postal 03400, México, Distrito Federal, teléfonos 0155199395 y 01553819006.**
- Barrera S. H. A., Villalobos T. C., Cerda R. M. 1999. Tras el rastro de la huella genética. Ciencia UANL/vol. II No. 2.**
- Bernal J. 1997. Identificación con Marcadores Genéticos. Super Campo. pp. 120-124**
- Botstein D., White R. L., Skolnick M. And Davis R. W. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphism's. American Journal of Human Genetics. 32: 314-331.**

- Chakraborty R. 1999.** Statistical issues regarding the use of microsatellite loci for molecular anthropological studies. *Genomic Diversity: Applications in Human Population Genetics* edited by Papiha, Deka and Chakraborty, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York. pp: 223-235.
- Chris S., Martin J. C., Voyta and Botestein I. 1996.** Chemiluminescent Detection of Multiplex Labeled MS Markers and DNA Sequences and Evaluation of New Membrane Surfaces. Abstracts Scanned from text submitted for January 1996 DOE Human Genome Program Contractor- Grantee Workshop.
- 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, USA.
- 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>)
- Carleos C., Baro J. A., Carretero, Y., Checat M. L., Dunnert S., Cañont J. 1999.** Clasificación Racial mediante microsatélites. Tomado de página en internet: http://etsia.upv.es/acteon/jcanon_i.htm
- Cerda-Flores R. M. 2001.** Genetic Admixture and Structure of the Populations of Northeastern Mexico, using Molecular Autosomal, Y-Chromosome, and Mitochondrial Markers., Mexico. Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en colaboración con The University of Texas-Houston.
- Committee on DNA forensic Science; Commission on DNA forensic Science. 1996.** The Evaluation of Forensic DNA Evidence. National Research Council, National Academy Press. Washington D.C. pp.47-74

- Deacon N. J. and Lah M. 1989.** The potential of the polymerase chain reaction in veterinary research and diagnosis. *Aust. Veterinary Journal.* 66:442-444.
- Devlin B. and Risch N. 1992a.** Ethnic Differentiation at VNTR Loci with Special Reference to Forensic Applications. *American Journal Genetics.* 51: 534-548.
- Devlin B. and Risch N. 1992b.** A Note on Hardy-Weinberg Equilibrium of VNTR Data by Using the FBI's Fixed-Bin Method. *American Journal Genetics.* 51: 549-553.
- Dietz A.B., Womack J.E., Swarbrick P.A., Crawford A.M. 1993.** Assignment of five polymorphic ovine microsatellites to bovine syntenic groups. *Animal Genetics.* 24: 433-436.
- Dogson J. B., Cheng H. H., Okimoto R. 1997.** DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science.* 76 (8): 1108-14.
- Fries R., Eggen A., Womack J. E. 1993.** The bovine Genome Map. *Mammalian Genome.* 4: 405-428.
- Goldstein D. B. and Schlötterer C. 1999.** MICROSATELLITES Evolution and Applications. Oxford University Press, Inc., New York. pp.1-23.
- Guérin G., Nocard M., Kemp S. J. 1994.** Fifteen new syntenic assignments of microsatellites to the bovine genome. *Animal Genetics.* 25: 179-181.
- Guizar-Vazquez J. 2001.** *Genética Clínica Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades Hereditarias.* 3a. Edición Apéndice I: La Huella Genética o Perfil del DNA (Héctor Rangel Villalobos).
- Hanslik S., Harr B., Brem G., Schlötterer C. 2000.** Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary new world and old world Holstein Friesian populations. *Animal Genetics.* 31: 31-38.

Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S.R., Vance and Vogt P. H. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and step-by-step Protocol. Biotechniques. 23: 504-511.

Hirano T., Nakane S., Mizoshita K., Yamakuchi H., Inoune-Murayama M., Watanabe T., Barendse W., Sugimoto Y. 1996. Characterization of 42 highly polymorphic bovine microsatellite markers. Animal Genetics. 27: 365-368.

<http://marc.usa.gov>. PhD. Eduardo Casas, Research Geneticist, U. S. Meat Animal Research Center, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture. Comunicación Personal.

Jiménez N., Folch J., Fernández-Arias A., Guiral J., Sánchez A. 1999. Estudio genético mediante marcadores microsatélites de las poblaciones de cabra montés. Tomado de página en internet: <http://etsia.upv.es/acteon/njimenez.htm>.

Lehninger A. L., Nelson D. L. and Cox M. W. 1993. Principles of Biochemistry. Second Edition. Work Publishers, Inc.

Ma R. Z., Russ I., Park C., Heyen D. W., Beever J.E., Green C. A., Lewin H. A. 1996. Isolation and Characterization of 45 polymorphic Microsatellites from the Bovine Genome. Animal Genetics. 27: 43- 47.

Meuwissen T. H. E., Van Arendonk J. A. M. 1992. Potential Improvements in Rate of Genetic Gain from Marker-Assisted Selection in Dairy Cattle Breeding Schemes. Dairy Science. 75: 1651-1659.

Mezzelani A., Zhang Y., Redaelli L., Castiglioni B., Leone P. Williams J.L., Solinas Toldo, S., Wigger G., Fries R., Ferretti L. 1995. Chromosomal localization and molecular characterization of 53 cosmid-derived bovine microsatellites. Mammalian Genome. 6: 629-635.

- Mommens G., Van Zeveren A., Peelman L.J. 1998.** Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity cases in American bison, *Bison bison* L. *Animal Genetics* 29: 12-28
- Moore, S. S.; Barendse, K. T.; Berger, K. T.; Armitage, S. M. And GenBank databases. 1992.** Bovine and ovine DNA microsatellites from the EMBL and GENBANK databases. *Animal Genetics*. 23: 463-467.
- Oldroyd B. & School of Biological Sciences Teaching Development Unit, University of Sydney. 1998.** Información sobre análisis de microsatélites en internet. <http://bugs.bio.usd.edu.au/dna/DNAContents.html>.
- Ron M.; Band M.; Yanai, A; Weller, J. I. 1993.** Unequivocal determination of sire allele origin for multiallelic microsatellites when only the sire and progeny are genotyped. *Animal Genetics*. 24: 171-176.
- Ron M.; Band M.; Yanai, A; Weller, J. I. 1994.** Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. *Animal Genetics*. 25: 259-264.
- Ron M.; Lewin, H.; Da, Y.; Band M.; Yanai, A; Blank, Y.; Feldmesser, E.; Weller, J. I. 1995.** Prediction of informativeness for Microsatellites markers among progeny of sires used for detection of economic trait Loci in Dairy cattle. *Animal Genetics*. 26: 439- 441.
- Schnabel, R. D.; Ward, T. J.; Derr, J. N. 2000.** Validation of 15 microsatellites for parentage testing in North American bison, *Bison bison* and domestic cattle. *Animal Genetics*. 31(6):360-366.
- 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.
- Trommelen, G.J.J.M., DenDaas, J.H.O., Vijg, J. & Uitterlinden, A.G. 1993.** DNA profiling of cattle using micro- and minisatellite core probes. *Animal Genetics*. 24: 235-241.

- Usha, A.P., Simpson, S.P. & Williams, J.L. 1995.** Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Animal Genetics*. 26: 155-161.
- Vankan, D . M.; Faddy, M. J. 1999.** Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple-sire matings. *Animal Genetics*. 30: 355-361.
- van Hooft, W.F.; Hanotte, Wenink, P.W.; Groen, A.F.; Sugimoto, Y.; Prins, H. H. T.; Teale, A. 1999.** Applicability of bovine microsatellite markers for population genetic studies on African buffalo (*Syncerus caffer*). *Animal Genetics*. 30: 214-220.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Diana Cosette Gallardo Blanco
Médico Veterinario Zootecnista

**Candidata para el grado de Maestría en Ciencias
con Especialidad en Genética Animal**

**Tesis: DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE VARIANTES Y FRECUENCIAS GÉNICAS DE 8
MICROSATÉLITES DE ADN EN GANADO SUIZO Y BEEFMASTER DE REGISTRO EN EL NOROESTE
DE MÉXICO**

Campo de Estudio: Genética Animal

Biografía:

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 5 de marzo de 1974, hija de Hugo Gallardo González y Elvira Blanco Flores.

Educación:

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (1991-1996), grado obtenido Médico Veterinario Zootecnista, Título de la tesis de Licenciatura: Determinación de la Densidad Ecológica del Venado Cola Blanca (*odocoileus virginianus texanus*) en el Noreste de México, presentada en mayo de 1997.

Experiencia Profesional:

1. Ejercicio de Clínica de Pequeñas Especies de 1996 al 2002
2. Tesis de licenciatura en la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Nuevo León de 1996 a 1997
3. Estancia laboral en el Centro de Investigación de Estudios Avanzados en Salud Animal de 1997 a 1998
4. Estudios de maestría en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León de 1999 al 2001
5. Clases de licenciatura en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León: Toxicología, Fisiología, Biología Celular, Bioquímica y Anatomía de febrero de 1999 al mes de agosto del 2001
6. Colaboración con temas de Biología Celular en la maestría de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León durante el año del 2001
7. Colaboración en el departamento de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León durante el año de 1999
8. ACTUAL: Propietario de una Clínica de Pequeñas Especies de Julio del 2001 al momento.



