



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA DEL ÁCIDO DESOXI-  
RRIBONUCLEICO RECOMBINANTE EN EL GANADO BOVINO  
Y PORCINO: ESTUDIO RECAPITULATIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ZÁRATE PADILLA SERGIO EDUARDO

Asesorado por:

Dr. José Manuel Berruecos Villalobos

Dr. Edmundo Calva Mercado





Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA DEL ÁCIDO DESOXI-  
RRIBONUCLEICO RECOMBINANTE EN EL GANADO BOVINO  
Y PORCINO: ESTUDIO RECAPITULATIVO**

**Tesis presentada ante la  
División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
de la  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Para la obtención del título de  
Médico Veterinario Zootecnista  
por**

**ZÁRATE PADILLA SERGIO EDUARDO**

**Asesorado por:**

**Dr. José Manuel Berruecos Villalobos**

**Dr. Edmundo Calva Mercado**

**México, D. F., 1988**

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN . . . . .	1
INTRODUCCIÓN. . . . .	2
ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN. . . . .	5
A) AISLAMIENTO DE GENES. . . . .	5
B) APLICACIONES PARA EL DESARROLLO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DEL GANADO BOVINO Y PORCINO . . . . .	13
C) APLICACIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS PARA EL GANADO BOVINO Y PORCINO . . . . .	19
D) APLICACIÓN EN PROGRAMAS DE SELECCIÓN DE GANADO BOVINO Y PORCINO. . . . .	30
E) OTRAS APLICACIONES. . . . .	37
CONCLUSIONES. . . . .	44
GLOSARIO. . . . .	46
LITERATURA CITADA . . . . .	49

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	<u>Página</u>
Cuadro # 1 GENES QUE SE HAN CLONADO DE GANADO BOVINO Y PORCINO. . . . .	11
Cuadro # 2 ALGUNOS DETECTORES QUE SE HAN UTILIZADO PARA DIAGNOSTICAR ENFERMEDADES EN EL GANADO BOVINO Y PORCINO . . . . .	15
Cuadro # 3 ALGUNAS BACTERIAS ANALIZADAS CON EL USO DE LA TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE . .	26
Figura # 1 MAPA DE RESTRICCIÓN DEL ADN Y ANÁLISIS SOUTHERN DEL GENOMA . . . . .	33

R E S U M E N

ZARATE PADILLA SERGIO EDUARDO. Aplicaciones de la tecnología del ácido desoxirribonucleico recombinante en el ganado bovino y porcino: Estudio recapitulativo (bajo la dirección de: Dr. José Manuel Berruecos Villalobos y Dr. Edmundo Calva Mercado).

El presente trabajo tiene el objetivo de contribuir a la difusión de los conocimientos de las aplicaciones que tiene la tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética molecular en la producción de ganado bovino y porcino. Las técnicas de recombinación de ADN pueden ser consideradas como un elemento valioso para mejorar la producción de ganado bovino y porcino. De esta manera, los avances que se han conseguido hasta la fecha incluyen: un incremento en el conocimiento de la composición genética de estas dos especies, la creación de agentes de diagnóstico, la producción de vacunas, un gran potencial en técnicas de selección de ganado, la creación de animales transgénicos, el análisis y manipulación del complejo principal de histocompatibilidad (responsable en gran forma de la resistencia de los animales a las enfermedades) y la producción de productos farmacéuticos, entre otros. Para la realización del presente trabajo se utilizaron los servicios bibliotecarios de las siguientes instituciones de la U.N.A.M.: Centro de Investigación Científica y Humanística, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Se consultaron y analizaron 268 referencias y se agrupó la información en 9 capítulos.

## INTRODUCCIÓN

En el siglo pasado, el austriaco Gregorio Mendel, descubrió que la herencia obedece a leyes estadísticas precisas; postuló que las características de las plantas son transmitidas a sus descendientes a través de determinantes, hoy en día llamados genes. Esta revelación abrió la puerta a un campo muy amplio en la investigación científica (19,133,173,241,252).

En 1953 F. Crick y J. Watson descubrieron que el ácido desoxirribonucleico (ADN) tiene una hélice complementaria doble. Cada hélice está formada por una cadena de polinucleótidos; cada nucleótido está formado por un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato. El orden de las bases nitrogenadas a lo largo de la cadena determina el código genético de un organismo (133,153,196,221,238,241,252,260).

H. Smith, K. Wilcox y sus colaboradores aislaron en 1970 la primera endonucleasa de restricción. Estas enzimas cortan en secuencias específicas en la molécula de ADN. Los fragmentos, generados por el corte con enzimas de restricción, pueden unirse o recombinarse con fragmentos de otro origen para producir así el "ADN recombinante" y a los métodos para lograrlo se conocen como "tecnología del ADN recombinante" o "ingeniería genética molecular". El ADN recombinante se puede generar in vitro insertando genes o secuencias de ADN de un organismo en vectores de clonación (plásmidos, fagos o cósmidos). Estos, al replicarse en bacterias, producen múltiples copias de su genoma híbrido; de esta manera, los genes deseados se clonan y recuperan posteriormente (1,18,33,34,47,67,104,185,225,226,233,234,239,241,243,260).

La tecnología del ADN recombinante es una de las principales revoluciones científicas de este siglo, con un gran potencial económico (76,174).

La ciencia básica de la genética molecular es dinámica, esto permite avanzar día a día en el conocimiento de nuevas técnicas para la manipulación del ADN y para crear nuevos productos útiles al Hom-

bre y a los animales. Por ejemplo, por medio de esta tecnología ha sido posible la obtención eficiente de productos para el hombre tales como: insulina, hormona del crecimiento, calcitonina, interferones y factores de coagulación, entre otros (1,2,33,34,44,67,79,85, 89,161,188,223,257).

Mediante la inserción en forma funcional de un gen clonado al genoma de un individuo se puede explotar su actividad biológica normal, transformando las características genéticas del individuo receptor. En otras palabras, se puede programar genéticamente al individuo receptor (228,234,253).

Actualmente es posible sintetizar químicamente el ADN, esto constituye una herramienta poderosa que forma parte de las técnicas modernas en ingeniería genética y biotecnología. Estas técnicas permiten entre otras cosas, manipular con total libertad material genético de cualquier origen. Además, un gen puede ser usado para la detección y aislamiento de secuencias nucleótidas específicas de interés terapéutico y de diagnóstico (226). (49) (117)

Los genes clonados se pueden marcar con fosfato 32 para usarlos como "detectores" que hibridizan con determinados fragmentos de ADN.

Estos detectores han sido utilizados en genética humana como marcadores genéticos llamados "polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción" (PLFR), para el diagnóstico pre y postnatal de enfermedades genéticas y para el mapeo de cromosomas (20,25,71, 104,227,254,256,257).

Las características de importancia económica en medicina veterinaria y los loci poligénicos involucrados en su expresión son llamados "loci de características cuantitativas" (LCC). Los LCC se podrían identificar por medio del uso de los PLFR para establecer mejores programas de selección de animales (227,228).

La American Veterinary Medical Association estima que las pérdidas económicas en el ganado, debido a enfermedades infecciosas, es de varios millones de dólares al año. Está ampliamente aceptado



que muchos brotes de enfermedades devastadoras ocurren porque los an  
tibióticos <sup>no</sup> son ~~efectivos~~ para controlarlas o limitar su severidad  
y porque no es fácil producir vacunas efectivas. Por lo tanto, el  
impacto más inmediato que puede tener la tecnología del ADN recombi-  
nante es en la producción de vacunas (44,205,244,254,259).

Países en vías de desarrollo, con numerosas granjas pequeñas y  
pobres, podrían ganar enormemente con los avances en ingeniería gené  
tica, los cuales ofrecen la esperanza de incrementar y estabilizar  
la producción agrícola y ganadera (239).

Estas y otras aplicaciones, en especial para el ganado bovino y  
porcino serán referidas con más detalle en el presente trabajo, cuyo  
objetivo es el de contribuir a la difusión de los conocimientos so-  
bre ingeniería genética molecular que tienen y pueden tener aplica-  
ciones en el mejoramiento de la producción del ganado bovino y por-  
cino. Para una mejor comprensión de algunos de los términos utili-  
zados en el presente trabajo, se sugiere consultar el glosario.

ANÁLISIS DE LA INFORMACION

A) AISLAMIENTO DE GENES

El conocimiento de las nuevas técnicas para analizar la estructura, la función y la manipulación del genoma de un organismo a través de la tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética molecular, es un requisito fundamental para la obtención de productos útiles al hombre y a los animales a través de la biotecnología (1,2, 33,34,44,67,79,85,89,161,188,223,226,257).

Localización de genes:

Los primeros trabajos de localización de genes datan desde 1915 y fueron realizados en la mosca de la fruta. En ésta, se determinó la localización precisa sobre los cromosomas de 85 genes mutantes (257).

La técnica de hibridación celular fue el primer sistema de transferencia de genes en ser desarrollado y fue adaptado para mapear genes. Esta técnica proporciona un sistema rápido, eficiente y económico para mapear genes. Más de doscientos genes fueron mapeados en el hombre en la década pasada con el uso de esta técnica.

Por ejemplo, en el cerdo las enzimas MPI y NP se localizaron en el cromosoma número 7, fusionando células del mieloma del ratón y esplenocitos del cerdo (57,208).

Gracias a las nuevas técnicas de recombinación in vitro de genes, se descubrió que en organismos eucariotes existen regiones de ADN que no codifican y que actúan interrumpiendo las secuencias de los genes que sí codifican, llamados intrones y exones respectivamente. La extensión de los análisis de recombinación in vitro a familias de genes y regiones cromosomales, permitirá la construcción de mapas detallados de los cromosomas y de estos datos seguramente surgirán principios generales acerca de la organización y regulación del genoma (34).

Un mapa de genes consiste en la asignación de un gene o grupo de genes a un sitio específico del cromosoma (34,204).

El uso de los genes y no de sus productos representa una valio-

sa herramienta para realizar estudios genéticos. Si un gene es clonado y marcado radioactivamente, puede funcionar como un marcador genético de alta resolución. Por medio de hibridización in situ de estos genes con los cromosomas intactos, es posible identificar el sitio que ocupa el gene en las bandas y sub bandas de los cromosomas fijados en metafase, al observarlos al microscopio. De esta manera, se ha asignado una localización tentativa del complejo principal de histocompatibilidad del bovino en el cromosoma número 23 y una localización definitiva de estos genes en el cromosoma número 7 del cerdo (75,84,199,220).

Si el gene que se clonó es marcado con fosfato 32 puede servir, como ya se mencionó, como marcador genético al hibridizar con segmentos de ADN (cortado con enzimas de restricción y desnaturalizado) con los que comparta homología en su secuencia de bases, produciéndose lo que se llama polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR). Los PLFR han sido utilizados para asignar localizaciones a los genes en los cromosomas humanos. Esta técnica puede permitir completar el mapeo del 95% del genoma humano (20,24,71,80, 104,227,254,257).

#### Construcción de bibliotecas o bancos genómicos:

Una biblioteca o banco de genes es la colección completa de secuencias de ADN en las cuales está representado el genoma de un organismo (46,233,234,239).

Comúnmente, los bancos de genes contienen un gran número de ellos, así que si queremos un gen en particular, éste puede ser aislado de los bancos (45).

Existen dos tipos de bancos; el banco genómico y el de ADN complementario. El banco genómico es una colección de piezas de ADN que representa el genoma completo de organismos evolucionados y están contenidas en vectores de clonación. El banco de ADN complementario es una colección de piezas de ADN que únicamente representa el ADN

que puede transcribirse a ARN mensajero (exones), dichas piezas también están contenidas en vectores y se sintetizan a partir de moldes de ARN mensajero. El contenido del banco de ADN complementario depende mucho del tipo de células utilizadas para aislar el ARN mensajero usado en su construcción, ya que los procesos de transcripción varían entre las diferentes células de los tejidos (45).

Construcción de bancos genómicos: para construir un banco genómico se requiere preparar el ADN en fragmentos mayores de 100 kilobases (100,000 pares de bases en una doble cadena de ADN). Estos fragmentos se rompen en pequeñas unidades a través de digestiones parciales con enzimas de restricción o por corte mecánico (para obtener fragmentos de diferente tamaño se varía la cantidad de enzima y el tiempo de exposición) y se insertan en vectores o vehículos de clonación. Básicamente se usan tres tipos de vectores: plásmidos, fagos o cósmidos (el vehículo a escoger depende del tamaño de los fragmentos y de la aplicación que va a tener en el banco) los cuales tienen en común varias propiedades, entre las cuales podemos mencionar que; usualmente contienen genes de resistencia a antibióticos, lo que permite que sean fácilmente aislados y detectados y que contienen sitios únicos de corte para varias enzimas de restricción lo que ayuda a la inserción de fragmentos de ADN (45,68).

Por ejemplo, el bacteriofago lambda infecta a Escherichia coli y puede crecer como lisógeno, en donde se incorpora al cromosoma huésped y se replica junto con éste. Alternativamente, puede lisar a la célula después de haber producido varias decenas de progenie, o sea que entra en una fase lítica. Un fago lambda en fase lítica puede funcionar como vehículo de clonación. El ADN del fago lambda al ser digerido con enzimas de restricción genera fragmentos dispensables e indispensables para el crecimiento lítico. Los fragmentos dispensables pueden sustituirse por ADN exógeno para producir moléculas recombinantes que son incorporadas dentro de la cápside del fago, mediante incubación en sistema libre de células. De esa manera, el ADN recom

binante se podrá replicar muchas veces en una célula bacteriana emergiendo en una forma de partícula viral completa, la cual reinfecta posteriormente a otra bacteria para repetir el ciclo de amplificación en un césped de Escherichia coli (46,233).

Cuando el vehículo es el "Caronte 4" del fago lambda, el ADN del vector (de 46 kilobases) se anilla y se liga por sus extremos. Ensayo se corta con la enzima de restricción EcoRI. Esto produce 3 fragmentos: el mayor (de 30 kilobases), contiene segmentos del extremo derecho y del extremo izquierdo (brazos) del genoma, los cuales son indispensables para el crecimiento lítico y dos fragmentos menores (de 7.2 y 6.6 kilobases) internos y dispensables para el crecimiento lítico. Los brazos se separan por centrifugación en gradiente de sacarosa, se dializan para eliminar sales y sacarosa y se ligan al ADN exógeno que se va a clonar por medio de adaptadores sintéticos que generan extremos cohesivos al ser cortados con la enzima EcoRI (algunas enzimas de restricción como la EcoRI, al cortar sobre la doble cadena de ADN, producen en cada extremo un corte tal que quedan tres nucleótidos de una de las dos cadenas sin aparearse, estos nucleótidos tienen la posibilidad de aparearse con tres nucleótidos complementarios de otro extremo de ADN, producido a su vez por el corte con la misma enzima de restricción o con otra que realice un corte similar, por esto son llamados extremos cohesivos). Antes de unir el ADN del vector con el ADN exógeno, este último se corta parcialmente con la enzima EcoRI a un tamaño medio de 18 kilobases. Alternativamente, se puede digerir parcialmente el ADN exógeno con las enzimas HaeIII y AluI, estas enzimas reconocen sólo cuatro pares de bases y por lo tanto tienen mayor probabilidad de corte que EcoRI, por lo tanto, existen más probabilidades de abarcar todo el genoma.

Por último, una vez generadas las moléculas de ADN recombinante, estas son encapsuladas in vitro para formar un fago completo y reproducirlo en bacterias (46,233,234).

Investigaciones recientes encontraron un nuevo vector llamado

cósmido. Los cósmidos son híbridos de bacteriófago y plásmido. El cósmido contiene la parte de ADN del bacteriófago necesaria para la inserción y "empaquetado" dentro de la cabeza del bacteriófago y algunas de las características de autoreplicación del plásmido. Debido a esto, el cósmido puede acomodar fragmentos de ADN largos (de aproximadamente 35 a 45 kilobases) y es útil en el estudio de ADN de gran extensión y de regiones adyacentes a un gene conocido (45,234).

Construcción de bancos de ADN complementario: se construyen en forma similar a los bancos genómicos, solo que el ARN mensajero es preparado en lugar del ADN. Puesto que la mayor parte de los ARN mensajeros tienen una cola poli(A) (numerosas repeticiones de la base adenina en el extremo de la molécula de ARN mensajero), el ARN mensajero puede ser separado de otros ARNs pasándolo por una columna oligo(dt)<sup>1</sup>. El ARN mensajero es usado para formar el ADN complementario por medio de la acción de la enzima reversa transcriptasa, la cual transcribe al ARN mensajero en ADN. Como en la construcción de los bancos genómicos, éste es insertado y propagado en vectores de clonación (45).

Genes aislados de ganado bovino y porcino:

Uno de los genes que se han aislado y que más ha llamado la atención es el que codifica para la hormona del crecimiento bovina.

Esta hormona sólo había sido posible obtenerla a partir de cientos de glándulas pituitarias. Por lo tanto, las expectativas para producirla a partir de microorganismos programados por ingeniería genética molecular son muy grandes debido a la posibilidad que existe de usarla como promotor del crecimiento, reemplazando a los esteroides usados para este fin (76, 104, 111, 160, 173, 174, 188).

La administración de la hormona, en vacas productoras de leche, incrementa considerablemente la producción de leche y reduce la cantidad de leche disponible para la producción láctea.

1.- Oligo(dt) = Marca registrada.

alimento requerido para una alta producción. El 10 de abril de 1986 se solicitó a la FDA (Food Drug Administration) de Estados Unidos su aprobación para la producción de la hormona a nivel comercial (121, 180).

En el cuadro número 1 se presentan algunos de los genes que se han clonado del ganado bovino y porcino y en su caso, algunas de las aplicaciones sugeridas por los autores.

CUADRO # 1 GENES QUE SE HAN CLONADO DEL GANADO BOVINO Y PORCINO

BOVINOS

GENE	PB <sup>®</sup>	BANCO	ACCION FISIOLÓGICA	UTILIDAD	FUENTE
Tiroglobulina	2,831	genómico	proteína precursora de la hormona tiroidea	comercial	158
γ-cristalina	522	genómico	proteína del cristalino de vertebrados	diferenciación y desarrollo de fibras celulares del cristalino	29
Prolactina	30	genómico y complementario	hormona polipéptica esencial para la lactogénesis	comercial	139 214
Renina	-	complementario	enzima proteolítica del abomaso de becerros	producción de quesos	63,152 164
Caseína <sub>α<sub>1</sub></sub>	1,194	complementario	principal proteína de la leche	suplemento de aminoácidos a infantes	235
Precursor oxitocina-neurofisisina <sub>1</sub>	315	complementario	hormona de neurohipófisis relacionada con el mecanismo del parto	comercial y filogenia de sus secuencias	127
Elastina	62,000	complementario	proteína de tejidos elásticos	-	58
Redopsina	64,000	complementario	pigmento protéico que absorbe la luz en la retina, responsable de la excitación por la luz	análisis de la estructura de pigmentos humanos	28 177
Corticotropin-lipotropin	1,091	complementario	hormona con actividad melanotrópica y corticotrópica	-	175
Preproencefalina <sub>1</sub>	1,222	complementario	hormona pituitaria opiácea	-	184



CUADRO # 1 Continuación

GENE	PB <sup>Ⓢ</sup>	BANCO	ACCION FISIOLOGICA	UTILIDAD	FUENTE
Tiroglobulina	8,431	complementario	hormona tiroidea esencial esencial para el crecimiento y desarrollo neurológico	-	158 159
Factor de crecimiento de fibroblastos ácidos	440	-	mitógeno de células de origen mesodérmico y neuroectodérmico	induce crecimiento de vasos sanguíneos	134
<b>PORCINOS</b>					
Relaxina	300	complementario	dilata ligamentos de la pelvis y del cérvix en el parto	-	101
$\beta$ -necendorfina (precursor)	2,333	genómico	péptido endógeno con actividad opiácea		118
Prorrelaxina	-	genómico	precursor de la relaxina	-	236

Ⓢ PB- Pares de Bases

## B) APLICACIONES PARA EL DESARROLLO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DEL GANADO BOVINO Y PORCINO

Básicamente se han desarrollado dos métodos para producir agentes de diagnóstico; el primero, está basado en el uso de detectores (secuencias de ADN clonadas y marcadas radioactivamente) y el segundo, está basado en los anticuerpos monoclonales.

### Detectores:

Los métodos basados en la tecnología del ADN recombinante para diagnosticar enfermedades son altamente sensitivos y permiten establecer diferencias de las moléculas de ADN de diferentes especie. Estas propiedades han favorecido la aplicación de esta tecnología para detectar tanto enfermedades hereditarias como adquiridas, ampliando su papel dentro de la medicina olfínica (45,50).

En el hombre, se han podido diagnosticar una serie de enfermedades de origen hereditario como: anemia de células falciformes, deficiencia de alfa-1-antitripsina, fenilcetonuria, deficiencia de hipoxantina-guanina, fibrosis quística<sup>1</sup>, distrofia muscular Duchenne, enfermedad de Lesch-Nyhan, corea de Huntington, entre otras (50,220, 233).

El uso de secuencias de ADN, marcadas radioactivamente, ha proporcionado una excelente oportunidad para diagnosticar enfermedades adquiridas por el hecho de que hibridizan con secuencias específicas del agente infeccioso, esta propiedad también ha sido utilizada para: tipificar especies de patógenos, diferenciar infecciones de origen natural de las de origen vacunal y para detectar infecciones latentes.

Además, tiene la propiedad de que detectan en forma rápida y directa pequeñas cantidades de patógenos en fluidos corporales, biopsias o material postmortem. Gracias a esto no es necesario multiplicar la cantidad del germen patógeno por medio de su crecimiento en vivo o de

---

<sup>1</sup> Se logró diagnosticar en el Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la U.N.A.M. por el Dr. E. Calva y colaboradores. E. Calva, comunicación personal 1988.

realizar pruebas de neutralización, procedimientos que toman mucho tiempo. Una prueba basada en la tecnología del ADN recombinante puede hacerse en 24 horas (16,51,64,234,242,254,255). (60) (119) (179)

Se han destinado más cantidad de recursos en el desarrollo de técnicas para el diagnóstico de enfermedades del hombre que para las de los animales, debido al mayor potencial económico que existe en el primer caso. Sin embargo, el potencial que tienen los anticuerpos monoclonales y las replicas de ADN (detectores) en medicina veterinaria es tan grande que no debe ignorarse (51).

En el cuadro número 2 se presentan algunos de los detectores de interés en la producción bovina y porcina que se han usado con fines de diagnóstico.

#### Anticuerpos monoclonales:

En 1975, Köhler y Milsten reportaron el desarrollo de la tecnología de los anticuerpos monoclonales (AM), con ello se crea una revolución en la investigación médica (218,219).

La tecnología de los AM es una forma de la ingeniería genética, resultando en la producción de anticuerpos (Acs) específicos a través de líneas de cultivo de tejidos. Los AM son poblaciones homogéneas de moléculas de Acs idénticas (18).

La producción de AM involucra la creación de células híbridas o recombinantes para lo cual se siguen los pasos que a continuación se mencionan:

- 1.- Hiperinmunización: un ratón es inmunizado repetidamente con un antígeno (Ag) deseado.
- 2.- Colección de Acs producidos por el ratón: los Acs se extraen de las células del bazo del ratón, de las cuales se obtienen los linfocitos B.
- 3.- Fusión de células: los linfocitos B extraídos del ratón se incuban con células tumorales (células del mieloma) de ratón, en un medio que contiene polietilenglicol para promover la fusión

**CUADRO # 2 ALGUNOS DETECTORES QUE SE HAN UTILIZADO PARA DIAGNOSTICAR ENFERMEDADES EN EL GANADO BOVINO Y PORCINO**

DETECTOR	ENFERMEDAD Y ESPECIE	FUENTE
H-ClaI (fragmento de ADN de 6 kilobases)	Fiebre porcina africana	240
Segmento ARN complementario y 7 fragmentos de ADN genómico clonados en <u>Escherichia coli</u>	Pseudorrabia porcina	100,157
St-B, Sta-H, Sta-P y LT (genes de toxina de <u>Escherichia coli</u> )	Colibacilosis enterotoxigénica bovina y porcina ( <u>Escherichia coli</u> K-88)	148,147 148,166
Segmentos de ADN marcado con biotina y ADN de un virus vacunal	Rinotraqueítis viral bovina	16,74 255

- de las células y en consecuencia, la formación del hibridoma.
- 4.- Selección de células híbridas: se transfieren las células a un medio conocido como HAT (hipoxantina, inoperin y timidina) el cual es tóxico para las células B y para las del mieloma pero no para las células híbridas.
  - 5.- Identificación de las células híbridas: las células híbridas son las que sobreviven en el medio antes mencionado, dichas células son suspendidas en un medio fresco en placas microtituladoras. Se incuba el fluido sobrenadante, después de la incubación es analizado para detectar la presencia del anticuerpo deseado usando diferentes técnicas inmunológicas. Solo una pequeña cantidad de células B producen el anticuerpo deseado.
  - 6.- Aislamiento de células híbridas: las células que producen el anticuerpo deseado pasan repetidamente por procesos de dilución.
  - 7.- Clonación: la célula híbrida, una vez aislada, es colocada en un medio de cultivo de tejidos fresco para promover su multiplicación. De esta manera, las clonas producen el anticuerpo deseado en grandes cantidades.
  - 8.- Producción de anticuerpos: los hibridomas pueden ser mantenidos en cultivos de tejido, produciendo 0.5 mg/ml o se pueden inyectar intraperitonealmente en ratones o ratas; las células híbridas se adhieren a la superficie serosa y se reproducen provocando la secreción de grandes volúmenes de anticuerpos ( 8 mg/ml).
  - 9.- Colección de los anticuerpos: para coleccionar los anticuerpos el animal se somete a eutanasia y se aspira el líquido ascítico que es el que contiene los anticuerpos (18,51,52,65,92,93,218, 219).

Dependiendo del uso que vaya a tener el anticuerpo, la purifica-

ción de este puede ser desde la simple centrifugación del líquido ascítico hasta gran cantidad de técnicas sofisticadas de purificación inmunológica (65).

La técnica de AM y el descubrimiento de que las células del sistema inmune se comunican entre sí por medio de factores peptídicos, permitirá el mejoramiento de las técnicas de diagnóstico (198)

El potencial de las aplicaciones de los AM es en medicina veterinaria enorme; uno de los usos es el diagnóstico de enfermedades ya que son altamente específicos, pudiéndose aislar los componentes inmunogénicos de antígenos complejos como los de bacterias, virus, hongos y parásitos, así como los de las células tumorales. Otra de las ventajas es que se pueden producir en altas concentraciones, por lo que se disminuye el costo de la prueba diagnóstica en comparación con anticuerpos y antitoxinas utilizadas en otros métodos. Por su especificidad los AM pueden utilizarse para diferenciar cepas que no se pueden diferenciar por métodos serológicos convencionales. Por ejemplo, AM que distinguen cepas diferentes del virus de parvovirus (18, 219).

Los AM pueden ser usados para preparar equipos (kits) comerciales para identificar patógenos; pueden servir como estándares internacionales para la identificación de cepas de rinoneumonitis, bruceelas y Vibrio cholerae (18,109,210,262).

Ya se han producido AM contra antígenos somáticos de Dirofilaria immitis, Babesia bovis, adenovirus, rotavirus y virus de la leucemia bovina (218).

En cerdos, a través de los AM se han desarrollado una serie de productos para diagnosticar y prevenir pseudorabia y para el ganado bovino para detectar Streptococcus agalactiae en muestras de leche y se produjeron y caracterizaron AM contra la exotoxina A de Pseudomonas aeruginosa, igualmente encontrada en problemas de mastitis (7, 43,87,89).

Existen cerca de 203 compañías en todo el mundo que están desa-

rrollando equipos de diagnóstico para uso en medicina veterinaria (201).

En suma, los AM tienen un gran potencial como un instrumento de la ingeniería genética, primero porque permite identificar antígenos útiles (por ejemplo, aquellos que inducen inmunidad de protección) y segundo, para ayudar en la clonación de los códigos genéticos de esos antígenos para la preparación de vacunas o de equipos de diagnóstico (140).

## ○ APLICACIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS PARA EL GANADO BOVINO Y PORCINO

Las pérdidas económicas atribuidas a las enfermedades de los animales están estimadas en cien millones de dólares al año en todo el mundo y muchas de las nuevas vacunas podrán aportar fácilmente muchos millones de dólares en el mercado, debido a que los programas de inmunización son una parte importante de la medicina preventiva en cerdos y bovinos. En cierta forma, el desarrollo de vacunas para la aplicación en animales ha avanzado más que las desarrolladas para humanos (43,201,216,229). (125)

Actualmente con los avances en inmunología, biología y genética molecular, se plantean nuevas alternativas para el desarrollo de vacunas en contra de toxinas y agentes infecciosos. Muchos de estos enfoques se encuentran en etapas de desarrollo, pero existen buenas razones para estar optimistas en cuanto a que el hombre se encuentra en el inicio de una nueva era; en la que las propiedades de las vacunas podrán estar controladas y manipuladas de una manera más racional de lo que hasta hoy ha sido posible. Además, se podrán producir vacunas a un menor costo y aún se podrán obtener algunas de las que no ha sido posible producir por métodos convencionales (9,34,40,89, 205,209).

La demostración conclusiva de que las secuencias de ADN puedan ser introducidas en bacterias a través de bacteriófagos o plásmidos y posteriormente replicadas como parte del ADN del vector, abrió inmediatamente la posibilidad de que la información codificada por el ADN exógeno introducido pudiera expresarse como producto proteico. De esta manera, proteínas valiosas por lo escaso se pueden producir en grandes cantidades a través de cultivos bacterianos en los que se puede alcanzar hasta un 20 a 75% del total de la proteína bacteriana (34,35,40,78,111,225,254).

1 En los virus ARN el genoma es transcrito a una copia de ADN antes de la clonación siguiendo el mecanismo de la reversa transcriptasa (22,78)



Dentro de las ventajas de las vacunas producidas por ingeniería genética podemos mencionar:

- Se pueden desarrollar vacunas para virus que crecen pobremente en cultivo celular y para los cuales, de alguna manera, no es posible producir dentro de poco tiempo por métodos convencionales (79).
- Son seguras y estables a temperatura ambiente y se pueden almacenar por largo tiempo (40,78,85,181).
- Se pueden obtener vacunas de composición precisa (40).
- Pueden ser de fácil manufactura, economía de producción y larga vida media (78).
- Pueden inducir respuesta humoral y celular (172).
- No existe dificultad para reproducir determinantes conformacionales del agente (9).
- Pueden manufacturarse en una forma tal que al ser administrada en una sola dosis induzcan inmunidad de larga duración (78).
- Pueden ser más puras, más seguras y con mayor potencia y eficacia si están correctamente designadas (40,48,78,181).
- Pueden proteger contra muchos tipos de virus presentes en una región geográfica determinada y no inducir reacciones adversas (172).

Se han desarrollado varios métodos para expresar proteínas que forman parte del agente infeccioso. A grandes rasgos, estos se pueden dividir en:

- Expresión de antígenos en procariotes
- Expresión de antígenos en eucariotes
- Expresión de antígenos en minicélulas bacterianas
- Expresión de antígenos en vectores virales como la vaccinia o el virus del papiloma bovino
- Atenuación por supresión de genes y con la posibilidad de sintetizar ADN, ARN y polipéptidos en forma sintética las opciones pa

ra producir vacunas efectivas se incrementa (19,35,41,112,120,  
142,145,193,202,208,212).

Vacunas:

A continuación se describen algunos de los avances logrados hasta la fecha en este renglón.

Fiebre aftosa: el virus de la fiebre aftosa es un picornavirus, pertenece al grupo de los aftovirus y es sin duda la enfermedad que más ha llamado la atención a los investigadores, debido a la gran variabilidad antigénica del virus y a que probablemente es la enfermedad más importante en los animales domésticos (30,31,167,174,181, 207,265).

Con las vacunas convencionales, ha habido grandes pérdidas económicas por deficiencias en su manufactura, además de que pueden producir reacciones pirogénicas, alérgicas, abortos, disturbios neurológicos y otras secuelas en los animales. El virus tiene siete serotipos con 65 o más subtipos. La cápside tiene cuatro polipéptidos principales: VP1, VP2, VP3 y VP4. El virus puede afectar a rumiantes y cerdos (31,70,167,181,188).

Ya se han aislado y clonado los genes que codifican para la glicoproteína VP1 y VP3: de la VP3 también se sintetizó un polipéptido químicamente y los resultados obtenidos fueron muy buenos porque protegen a los animales contra la exposición al virus (22,167,181). (126)

En 1982 J. Bittle observó que en la fracción VP1 reside gran parte de la variabilidad antigénica del virus. Por este hecho se clonó esta fracción en E. coli y se observó que produce altos niveles de anticuerpos neutralizantes en varias especies capaces de proteger a los animales contra desafíos con el virus (30,31,40,207,265).

Gracias a los esfuerzos realizados en la investigación con este virus, el departamento de agricultura de los Estados Unidos colaboró con una compañía privada para probar una vacuna recombinante contra la fiebre aftosa; los resultados obtenidos son muy buenos

(43,89)

Rabia: la rabia es una de las enfermedades más viejas conocidas por el hombre, es una zoonosis muy importante. Desde que Pasteur descubrió la primera vacuna hace más de 100 años, han surgido una gran cantidad de productos vacunales (3,41,122,258,264).

El único componente del virus de la rabia que es capaz de producir anticuerpos neutralizantes para proteger a los animales es una glicoproteína que éste contiene. Se ha clonado, expresado y caracterizado una glicoproteína biosintética del virus de la rabia y se reportaron resultados preliminares de que esta glicoproteína sufrió renaturalización oxidativa, lo que abre la posibilidad de producir una vacuna (149,157,264,266). (141)

Por otra parte, se logró crear una vacuna por medio de la recombinación del virus de la vaccinia con un segmento alterado de ADN complementario que codifica para la glicoproteína del virus rábico; el virus de la vaccinia recombinado produjo altos títulos de anticuerpos neutralizantes en conejos y protegió ratones contra desafíos con virus de campo de rabia (122).

En base a estos y a muchos otros estudios que se han realizado con el virus de la rabia, ya se logró producir una vacuna recombinante y se probó en Argentina (82,83).

Pseudorrabia: el virus de la pseudorrabia es un  $\alpha$ -herpesvirus tipo I que afecta a los animales salvajes y domésticos. El cerdo se considera el principal reservorio del virus, otros animales incluyendo ovejas, cabras, ganado bovino, perros o gatos pueden ser afectados (124,211)

Usando la técnica de plásmidos recombinantes con genoma viral, S. Kit y sus colaboradores suprimieron una porción del gene que codifica para la timidín quinasa, de una cepa Bucharest del virus. La supresión de este gene elimina la posibilidad de reversión a la viru

lencia y reduce la posibilidad de que la vacuna induzca morbilidad y muerte en borregos y becerros, reduce en gran forma el neurotropismo y virulencia en ratones, pollos, conejos y ovejas, siendo inmunógeno y avirulento en cerdos. Existe una vacuna con aprobación comercial para cerdos introducida al mercado en 1986, producida con esta técnica (43,124,150,211).

**Parvovirus:** una causa principal de falla reproductiva en cerdos es el parvovirus porcino. Este virus pertenece a un grupo que incluye parvovirus canino y parvovirus H-1. El parvovirus porcino no está antigénicamente relacionado con otros parvovirus. Ya se han construido clonas de fragmentos apropiados del virus que pueden ser útiles en la producción de péptidos para vacunas de subunidades contra parvovirus porcino, éstas incluyen las formas replicativas MADL-8 y MADL-2 de dos virus distintos de parvovirus porcino. La forma MADL-2 es la menos virulenta y se obtuvo una supresión en la región que codifica para la cápside protéica del virión, esto puede reducir el potencial patógeno, de forma replicativa MADL-2. Actualmente existe una vacuna comercial (43,113,165).

El parvovirus bovino es un parvovirus autónomo y tiene una ligera homología con el parvovirus B-19 humano, canino, panleucopenia y algunos del ratón, comparando las moléculas de ADN. Los estudios sobre las relaciones evolutivas entre estos tipos de parvovirus pueden ser útiles en la identificación de parvovirus y para designar una vacuna general contra parvovirus de estas especies (43,56,174).

**Gastroenteritis transmisible:** el virus de la gastroenteritis transmisible produce una enfermedad entérica letalmente contagiosa en cerdos, en lechones la mortalidad alcanza un 100% (114).

El virus de la gastroenteritis transmisible es un virus ARN envuelto del grupo de los coronavirus. Ya se clonó en Escherichia coli el gene que codifica para la glicoproteína Gp195 que forma la

superficie de protección que sobresale de la membrana del virus. Gracias a las propiedades de esta glicoproteína, puede ser usada como subunidad vacunal efectiva (22,114).

**Rotavirus:** los rotavirus son miembros de la familia reoviridae.

Se han tenido avances considerables para la preparación de vacunas sintéticas contra rotavirus. Los rotavirus producen diarreas en niños y animales jóvenes. Ya se han construido oligopéptidos sintéticos que mimetizan la región de la proteína VP7 que es la más probable de contener determinantes antigénicos capaces de producir anticuerpos neutralizantes (3,77).

Por otra parte, se ha intentado establecer la asignación de los genes que codifican para antígenos principales y para actividades funcionales de esos virus, con la intención de producir vacunas (99).

**Estomatitis vesicular:** es producida por un virus ARN y es una zoonosis. Se generó una partícula defectuosa que interfiere con las partículas DI<sup>LI</sup> por una supresión interna en el genoma de una cepa termoestable del virus. La partícula DI sintetiza una glicoproteína aberrante ARN mensajero in vivo, de esta manera se podrá producir una vacuna con características semejantes a la vacuna del virus de la pseudorrabia, producida por la técnica de supresión de genes (3,105,106,206).

También se han clonado glicoproteínas de superficie del virus y se recombinaron con el virus de la vaccinia el cual sintetizó los polipéptidos del virus (en el ganado, el grado de protección contra la inyección intradermolengual del virus de campo fue correlacionada con el nivel de anticuerpos neutralizantes, producidos después de la vacunación) (22,143).

**Fiebre del Valle Rift:** es producida por un virus ARN y es una zoonosis. Actualmente existe una vacuna producida por medio de la

tecnología del ADN recombinante en el mercado (3,22,43).

Además, existen vacunas preparadas por medio de la tecnología del ADN recombinante contra diarrea viral bovina, papilomatosis bovina y disentería porcina. También se han aislado inmunógenos de adenovirus y virus de la lengua azul con grandes posibilidades para clonarse y construir vacunas (22,43,174,188).23/

#### Bacterinas:

En el caso de bacterias se han realizado avances considerables en su estudio, muchos de los cuales representan una promesa para la producción de vacunas efectivas. En el cuadro número 3 se muestran algunas de las investigaciones que se han realizado en bacterias y en el hongo Histoplasma capsulatum, de interés en la producción de ganado bovino y porcino.

#### Antitoxinas:

Las toxinas son candidatos atractivos para su uso potencial como antígenos porque muchas de ellas son excelentes inmunógenos (72).

Se han preparado anticuerpos monoclonales específicos de K-99, un factor de invasividad de la Escherichia coli enterotoxigénica. Este antígeno es un antígeno de pili o vellocidades; las vellocidades secretan enterotoxinas para la patogenicidad y enterotoxigenicidad de la bacteria. Estos anticuerpos monoclonales mostraron tener efectividad para proteger becerros de un día de edad contra dosis letales de E. coli K-99 enterotoxigénica. Existe un producto comercial en el mercado para uso en becerros recién nacidos (43,90,174,176).

Para cerdos también se han preparado vacunas polivalentes recombinantes en contra de cepas enterotoxigénicas de E. coli K-88, K-99 y 987P. Las cerdas gestantes vacunadas produjeron anticuerpos específicos contra las microvellocidades adherentes y los anticuerpos fueron transferidos a los cerditos a través del calostro y de la le-

CUADRO # 3 ALGUNAS BACTERIAS ANALIZADAS CON EL USO DE LA TECNOLOGIA DEL ADN RECOMBINANTE

BACTERIA	INMUNÓGENO CLONADO O TIPO DE ESTUDIO	FUENTE
<u>Haemophilus influenzae</u> tipo B	P <sub>1</sub>	<sup>95</sup> <del>96</del> ,110
<u>Bordetella bronchiseptica</u> y <u>Bordetella parapertussis</u>	Genes de las toxinas S <sub>1</sub> y S <sub>2</sub> respectivamente	151 39,152
<u>Mycobacterium tuberculosis</u>	APP y L	137,267,268
<u>Mycobacterium paratuberculosis</u>	Análisis de enzimas de restricción	61
<u>Neisseria spp.</u>	PH y HS	6,32
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Fosfolipasa C	136,249
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	Librería de ADN complementario	59,250
<u>Leptospira</u> serogrupos <u>sejroe</u> y <u>pomona</u>	Homología de ADN	129
<u>Campylobacter fetus</u> subsp. <u>fetus</u>	Análisis de enzimas de restricción	69
<u>Streptococcus agalactiae</u>	Hibridización ADN-ADN	145,251
<u>Staphylococcus aureus</u>	Antígeno A	138,145
<u>Corynebacterium diphtheriae</u>	Gene de toxina A y B	146
<u>Bacillus anthracis</u>	Gene de toxina de factor de edema	162
<u>Bordetella pertussis</u>	Gene Cya de toxina adenil ciclasa	91
<u>Salmonella typhi</u>	Gene de antígeno de membrana externa <u>ompC</u>	197
<u>Escherichia coli</u>	Gene de pili de adherencia	115
<u>Rickettsia rickettsii</u> y <u>Rickettsia tsutsugamusi</u>	Antígenos de membrana externa	155,156,186
HONGU		
<u>Histoplasma capsulatum</u>	Expresión de genes durante una fase de transición	190

che. De esta manera, se previene la adherencia, colonización y la enfermedad en los lechones (116,188).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos aprobó dos bacterinas para tratar diarreas de becerros, una de ellas es un toxoi de (78,89,217).

#### Vacunas contra parásitos:

La producción de vacunas moleculares contra parásitos, en medicina veterinaria está limitada por el hecho de que los parásitos son organismos eucariotes complejos y a menudo viven en superficies de mucosas por lo que la respuesta a la vacunación resulta problemática.

Además, tenemos que añadir que la inmunogenicidad de los componentes de los parásitos es pobremente conocida (88,172).

Mientras que el genoma de un virus tiene cerca de 0.2 millones de pares de bases los genomas de protozoarios, como Trypanosoma y Plasmodium, tienen cerca de 40 millones de pares de bases (el genoma humano comprende 4,000 millones de pares de bases). El tamaño del genoma es proporcional a la complejidad del organismo y por lo tanto está relacionado con la dificultad para producir vacunas. Una desventaja substancial es que una gran coantidad de antígenos parasitarios no pueden ser clonados y expresados en E. coli (5,172). (3 6)

Actualmente existen mejores posibilidades de oportunidades económicas para producir vacunas contra enfermedades parasitarias, como en el caso de coccidiosis aviaria, babesiosis, anaplasmosis y hemoncosis, las demás son controladas por drogas antiparasitarias, pero si se desarrolla resistencia a las drogas, los incentivos para producir vacunas para las demás enfermedades parasitarias aumentarán (65,90,172). (23)

El único reporte publicado en el que se usan virus como vectores para vacunas contra parásitos es el virus de la vaccinia. Este, codifica para el determinante antigénico del circunsporozoito del parásito de la malaria, Plasmodium knowlesi. Debido al optimismo



por este descubrimiento, podemos asumir que muchos otros genes de parásitos pueden ser clonados en esta forma (9,41,172).

Una de las ventajas del virus de la vaccinia es que tiene un genoma grande y se pueden insertar simultáneamente un buen número de genes diferentes para hacer vacunas multivalentes. Con el uso de vacunas vivas, típicamente se induce inmunidad protectora de larga duración en respuesta humoral y celular. En respuesta, antígenos purificados inducen la producción de anticuerpos pero una pobre respuesta de células T. La respuesta de células T es importante en infestaciones parasitarias (172).

Los estudios del complejo principal de histocompatibilidad en animales domésticos y el futuro desarrollo de agentes tipificantes, son importantes para el desarrollo de vacunas moleculares contra parásitos, porque sólo ciertos haplotipos complejo principal de histocompatibilidad pueden responder a inmunizaciones a partir de antígenos parasitarios (en poblaciones con cruzamiento cerrado, pueden no desarrollar inmunidad después de la vacunación) (4,14,55,172,203,248).

Se pueden utilizar los anticuerpos anti-ideotípicos monoclonales (antígeno contra el que se dirige el anticuerpo) como vacunas potenciales, tal es el caso de la tripanosomiasis; estos inducen anticuerpos específicos en base a respuestas de células T citotóxicas e incluso inducen respuesta en animales cuyo haplotipo complejo principal de histocompatibilidad en otras condiciones no respondería (172).

Las vacunas recombinantes pueden no ser viables para ciertos parásitos, debido a que sus principales antígenos de superficie no son proteínas sino básicamente son carbohidratos. En los nemátodos, la cutícula está cubierta por una membrana, la epicutícula, la cual secreta un carbohidrato que contiene glicocalix. Se pueden encontrar altas concentraciones de mucopolisacáridos en la superficie de los parásitos e incluso la misma cutícula esta compuesta principalmente de colágena. El hapteno fosforil colina (FC) se descubrió en el extracto de muchos parásitos helmintos (los anticuerpos contra FC tie-

nen una función protectora contra parásitos), esto sugiere que las lipoproteínas de los parásitos son moléculas transportadoras de PC y que estas estructuras no protéicas son antígenos candidatos para vacunas potenciales o antígenos para estudios con anticuerpos anti-ideotípicos monoclonales. Los anticuerpos anti-ideotípicos monoclonales podrían utilizarse en vacunas contra hemoncosis y schistosomiasis (172).

El parásito Trichinella spiralis proporciona un excelente sistema para el desarrollo de vacunas contra helmintos y ya se identificaron dos antígenos que protegen a ratones y ratas contra desafíos con este parásito. Con el uso de métodos de clonación a partir de una preparación de ARN mensajero de una librería de ADN complementario de los genes que codifican para determinantes antigénicos se podría producir una vacuna efectiva (88).

Aún cuando no es posible predecir en este momento cuál o cuáles enfoques darán lugar al desarrollo de vacunas prácticas, todos ellos están contribuyendo de manera importante a comprender más íntimamente los problemas fundamentales involucrados en el desarrollo de vacunas y no sería raro que todos ellos dieran lugar a alternativas prácticas importantes. Rápidos avances en el conocimiento de las secuencias que codifican para componentes inmunogénicos se verán en pocos años (35,40).

## D) APLICACION EN PROGRAMAS DE SELECCIÓN DE GANADO BOVINO Y PORCINO

Los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR) son una herramienta muy útil para analizar el genoma de organismos; a continuación se explicará más en detalle que son los PLFR, cómo se forman y cómo se pueden emplear en programas de selección en el ganado bovino y porcino. Para más detalle acerca de las técnicas de corte con enzimas de restricción, electroforesis, transferencia tipo Southern y auto radiografía se sugiere consultar la tesis de García, V. G.<sup>1</sup>.

Después de la digestión del ADN con enzimas de restricción, se produce un número limitado de "fragmentos de restricción" de acuerdo con el número de sitios de restricción (sitios de corte) presentes en la cadena. Estos fragmentos pueden variar de longitud dependiendo de los sitios de restricción adyacentes y pueden ser separados por electroforesis en gel de acuerdo a su tamaño; así, un fragmento largo correrá una distancia menor en el gel que uno más corto y pueden observarse directamente en el microscopio de luz ultravioleta previa tinción con bromuro de etidio (227,258).

Si dos moléculas de ADN que generalmente son homólogas difieren en la presencia de un sitio de restricción, se forma un sitio polimórfico de restricción y algunos de los fragmentos variarían en su longitud después de la digestión enzimática, esto es, que un sitio polimórfico de restricción podrá formar un PLFR y puede visualizarse directamente como un patrón de bandeo diferente en el gel después de la electroforesis (182,227,254,257).

El genoma de organismos superiores contiene miles de nucleótidos, por lo que se formarían muchos fragmentos de restricción que se observarían en el gel en forma de un "barrido continuo"; si un sitio polimórfico de restricción está presente, el cambio resultante en la localización de uno de los fragmentos de restricción no será distinguido

<sup>1</sup> García V. G., Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot., U.N.A.M., México, 1988.

directamente, debido a que muchos otros fragmentos, de aproximadamente la misma longitud, están presentes. Por lo tanto, en vez de estar observando todos los fragmentos del total de ADN para detectar un PLFR, los fragmentos polimórficos específicos pueden ser identificados por hibridización con una secuencia específica de ADN clonada y marcada radioactivamente (detector) (200,227,234,254,257).

Para facilitar la hibridización del ADN, éste es generalmente transferido del gel a un soporte sólido (filtro de nitrocelulosa) por un procedimiento llamado transferencia tipo Southern. La hibridización toma lugar en los fragmentos inmovilizados en el filtro. Después de la hibridización se toman auto radiografías del filtro y se inspecciona la localización de las bandas que están unidas al detector. Cada banda representa la localización de los fragmentos de restricción que comparten homología con la secuencia marcada. Si en diferentes individuos de la misma especie los fragmentos de restricción detectados por el detector difieren en su longitud, éstos tomarán localizaciones diferentes a los patrones de bandeo en el gel y las bandas auto radiográficas diferirán en su correspondiente localización. De esta manera, será demostrado un PLFR. Se puede notar que esta técnica es limitada para el uso de los detectores que son homólogos con secuencias que están presentes sólo pocas veces en el genoma o si el detector fué homólogo para una secuencia altamente repetitiva. En este caso, el detector hibridizará con muchos puntos sobre el gel presentandose un barrido auto radiográfico que no permite observar bandas individuales (227).

Es necesario que el sitio polimórfico de restricción (por ejemplo, el que se produce por un cambio en uno de los nucleótidos que funciona como sitio de reconocimiento para una enzima determinada (mutación puntual)) este cerca o en la vecindad del sitio de unión de la secuencia marcada para que se detecte un PLFR (227).

La naturaleza de los cambios en la molécula de ADN que forman un PLFR, puede muchas veces ser determinada por consideración del

número de enzimas que muestran polimorfismo con un determinado detector y por los cambios en el tamaño de los fragmentos cuando el ADN es cortado siguiendo una metodología en el uso de enzimas de restricción.

Dichos cambios en el tamaño de los fragmentos son debidos en gran parte a los siguientes fenómenos:

**Mutación puntual:** es producida por el cambio en uno de los nucleótidos de un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción, produciendo un PLFR unicamente con la enzima específica para este sitio; el tamaño de los fragmentos serán monomorficos con todas las otras enzimas. Se espera que sea muy rara una recombinación entre mutación y marcador.

**Inserción o Supresión:** afecta generalmente un fragmento grande con todas las enzimas de restricción debido a que lleva sitios adicionales en el segmento añadido o suprimido, o debido a cambios en el tamaño de los fragmentos como un resultado de la presencia o ausencia del segmento de inserción.

**Inversión:** se debe a cambios en las distancias entre pares de sitios de restricción, el detector es agrupado cuando uno de los sitios está incluido en la secuencia invertida y podrán cambiar el tamaño de los fragmentos para enzimas que tienen un sitio de restricción dentro de la secuencia invertida (227,233,234)

Estos fenómenos se ejemplifican en la figura número 1.

De lo expresado anteriormente, resulta evidente que las secuencias clonadas, cualquiera que estas sean, pueden servir como detectores.

Las secuencias detectoras no tienen que ser homólogas a algún gene conocido. Además, el mismo sitio polimórfico de restricción no tiene que estar dentro de una secuencia codificadora (exon). El sitio de restricción polimórfico, localizado en intrones, ADN repetitivo o secuencias reguladoras, pueden producir un PLFR si están junto a la unión de la secuencia detectora (227)

Los PLFR son una nueva clase de marcadores genéticos descubier-

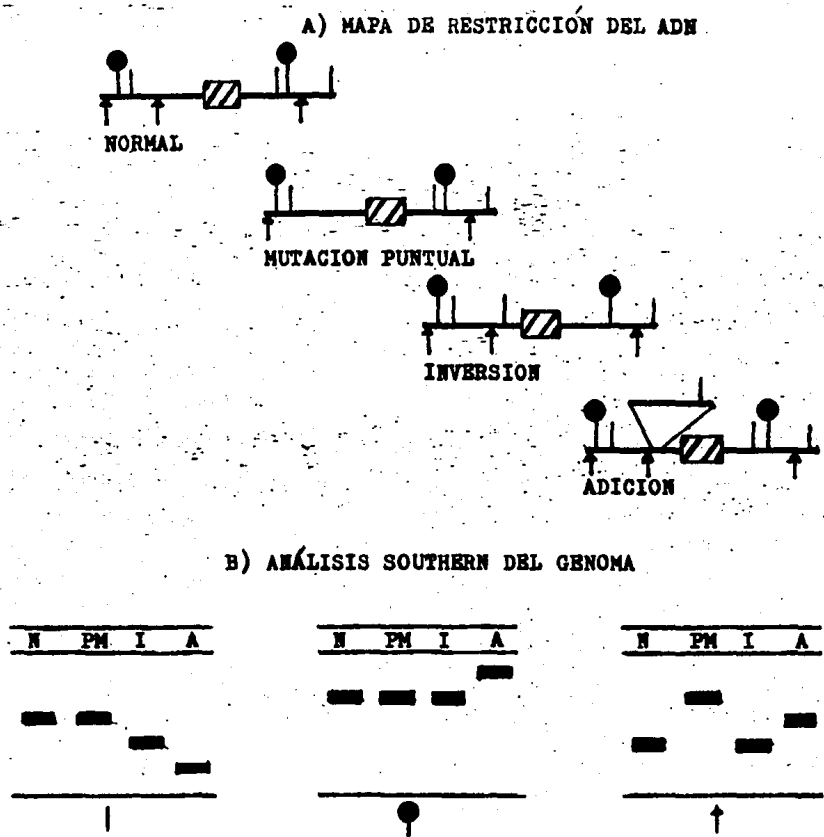


Figura # 1 Mapa de restricción del ADN y análisis Southern del genoma

- A) La distribución de los sitios de restricción para un número de enzimas en la vecindad de una secuencia detectora esta indicada por "flechas", "líneas" y "paletas"; la secuencia detectora se indica con un pequeño Se muestran tres cambios moleculares: Mutación puntual (pérdida de un sitio para la "flecha"), Inversión (involucra un sitio para una "línea") y Adición (también involucra un sitio para una "línea").
- B) Modelo de bandeó obtenido de cada una de las cuatro moléculas de ADN (N-normal, PM-mutación puntual, I-inversión y A-adición) después de la digestión con las enzimas indicadas y la hibridización con una secuencia detectora.

tos por medio de la tecnología del ADN recombinante (200,227,256, 257).

El desarrollo de mapeo del genoma incluye el uso de PLFR para determinar la localización aproximada en el cromosoma de uno o varios genes involucrados en una enfermedad. En el hombre por ejemplo, han sido utilizados en el diagnóstico prenatal de hemoglobinopatías y su utilidad se ha extendido para la detección de genes responsables de desórdenes genéticos como: distrofia muscular Duchenne, retinitis pigmentosa, corea de Huntington's y para detectar la variabilidad genética en los haplotipos de antígenos que no pueden ser detectados por medio de pruebas serológicas, como en el caso de la diabetes (200, 254,256,257).

En animales domésticos, los PLFR podrán ser usados para encontrar características de interés económico (dadas por uno o algunos loci genéticos) para mejorar los programas de selección y de cruzamiento entre razas (200).

M. Soller y S. Beckmann han sugerido otras aplicaciones potenciales: la primera, es como medio de identificación de parentesco, la segunda, es como marcadores auxiliares de la selección de sementales antes de entrar a una prueba de progenie y por último, para una introgresión rápida de una característica de una población a otra (por ejemplo, la resistencia a la tripanosomiasis) (25,26).

El mejoramiento genético esta limitado por el hecho de que las características económicas son poligénicas dentro de la naturaleza y están influenciadas por una gran variedad de factores medioambientales. En consecuencia, no es posible determinar el genotipo de un individuo, en lo que se refiere a valores económicos, por examinación exclusiva del fenotipo. Los métodos biométricos solo son válidos pa evaluar la magnitud de la variación genética y para guiar el proceso de selección de animales (26,218,254).

Las características cuantitativas de interés económico y los loci involucrados en su expresión son llamados "loci de característi-

ticas cuantitativas" (LCC). Una alternativa viable para identificar un LCC es el uso de los PLFR como marcadores genéticos, para monitorear la transmisión de los alelos LCC de padres a hijos, en el curso de los programas de mejoramiento (228,254).

Los estudios biométricos muestran que, en una población en particular, algunos alelos tienen efecto significativo en el valor económico y pueden ser fundamentados en la segregación de un pequeño número de LCC (10 a 20 para una característica particular o 100 a 2000 cuando consideramos todas las características económicas al mismo tiempo). Considerando que existen cerca de 50,000 códigos de secuencias en el genoma de eucariotes superiores y que muchas mutaciones puntuales (que afectan la función LCC) no cambian un sitio de restricción, la probabilidad de que una prueba fortuita detector-enzima tenga un efecto directo sobre las características económicas valiosas puede ser muy pequeño. Para incrementar esta probabilidad, se pueden usar detectores que tienen importancia en funciones fisiológicas de desarrollo (por ejemplo, varias hormonas <sup>proteínicas</sup> proteicas, interferones, glicoproteínas o genes que codifican para el complejo principal de histocompatibilidad) para detectar un PLFR asociado con un LCC. Además, esos PLFR son candidatos obvios para un estudio de efecto directo (20,63,127,139,144,152,158,164,214,227,254).

Los métodos basados en los marcadores genéticos como auxiliares de la selección pueden ser útiles únicamente cuando los otros métodos no miden el progreso apreciable, cuando gran número de descendientes se obtienen de un solo progenitor y cuando el costo económico de las evaluaciones de los PLFR así lo permita (26).

Una vez que un efecto directo sobre una característica de importancia económica fué asignado a un alelo particular PLFR, unas pocas generaciones de selección pueden ser suficientes para llevarla a altas frecuencias (26).

Una aplicación obvia de los marcadores auxiliares de la selección, es en situaciones en donde la raza donadora (por ejemplo, raza



nativa o silvestre) es caracterizada por tener altos valores de una característica fenotípica particular, mientras que la raza receptora tiene un mérito económico superior. La FAO por ejemplo, está explorando el potencial de los PLFR auxiliares de la introgresión como un medio para introducir genes para la tolerancia a la tripanosomiasis de la raza N'dama tolerante (del oeste de Africa) a poblaciones susceptibles de la raza cebú (26).

Una gran ventaja de este sistema de análisis del genoma es que se pueden evaluar becerros antes de que entren a un programa de pro- genie, por medio de la examinación de su genotipo. También se pueden evaluar toros después de haber muerto por análisis directo del ADN contenido en su semen mantenido en congelación (14,15,37,203).

En suma, un alelo PLFR que tenga un efecto económico directo puede rápidamente ser introducido de una población a otra, utilizando cruza apropiadas. Aunque puede existir cierta dificultad para detectar una combinación adecuada enzima-detector que tenga efecto directo en características económicas, una vez identificada el impacto en el mejoramiento genético del ganado será enorme. De gran ayuda pueden ser los estudios de PLFR del ganado bovino y porcino, porque aparte de que proporciona datos importantes acerca de su genoma, pueden ser útiles para buscar un efecto directo con LCC (14, 15, 25,26,54,55,84,200,248).

## OTRAS APLICACIONES

Cualquier grupo de investigación que trabaja con ingeniería genética molecular, ha reconocido que la posibilidad de obtener segmentos específicos de ADN de cualquier origen abre una serie muy amplia de posibilidades experimentales en biología y medicina. Esta alternativa tiene una importancia fundamental dentro de la investigación básica, ya que algunas de las interrogantes más importantes que se han formulado los biólogos por más de un siglo están íntimamente relacionadas con la organización y la expresión del material genético en las células de plantas y animales. A continuación, se mencionan otras aplicaciones, o posibles aplicaciones, para el mejoramiento de la producción del ganado bovino y porcino (34).

### Transferencia de genes:

Uno de los mecanismos de transferencia de genes que mas ha llamado la atención es el de la microinyección. Hasta hace cerca de diez años no se había podido introducir ADN extraño en células de organismos eucariotes, debido a la necesidad que existe de la acción coherente y complementaria de gran número de genes que conforman su genoma (34,234,254,257).

Dentro de los primeros reportes de introducción de material genético en células de organismos eucariotes está el gene de la globina humana a una célula de fibroblasto, usando como vector al virus SV40 del mono. En este caso se demostró evidencia física de transformación de la célula receptora (34,81,171,192,194,208,215,253).

Los primeros experimentos de microinyección fueron realizados por F. Anderson y sus colaboradores en 1980; ellos inyectaron una mezcla de dos plásmidos que contienen el virus herpes simple y el gene timidin quinasa y el gene beta globin humano en células de ratón (12, 13,215).

Con el desarrollo de esta técnica posteriormente fué posible producir lo que se llama ratones transgénicos; estos fueron formados por la microinyección del gene de la hormona del crecimiento de la rata

en embriones de ratón, estos embriones fueron implantados en hembras pseudogestantes para permitir su desarrollo y se obtuvieron ratones que crecieron más que los testigo y que expresaron altos niveles de la hormona del crecimiento en su suero, estos ratones fueron llamados "super ratón" (96,97,98,233,234).

El punto de mayor importancia en medicina veterinaria es que en los animales genéticamente modificados por esta técnica el ADN integrado aparece en todas las células del organismo adulto, incluyendo sus espermatozoides u óvulos; esto quiere decir que el gene introducido es transmitido a sus descendientes en una forma mendeliana. La creación de animales domésticos transgénicos es de interés obvio, por que se pueden realizar modificaciones genéticas de características de interés económico. Existen algunos candidatos obvios para tales transferencias entre animales de la misma o de diferente especie como: genes que confieren resistencia a enfermedades (por ejemplo, complejo principal de histocompatibilidad), genes que afectan hormonas de la reproducción y sus receptores (útiles en la manipulación de la ovulación en tiempo y frecuencia) y genes queratin (para modificar las características de la piel del ganado europeo que se intenta adaptar al trópico)(93,170,244).

E. Hammer y sus colaboradores produjeron ratones, borregos y cerdos transgénicos por microinyección. Ellos les microinyectaron los genes estructurales de la metalohienina y de la hormona del crecimiento humana. Los genes fueron incorporados en forma estable en la línea germinal (óvulos y espermatozoides) haciendo que el nuevo fenotipo adquirido se heredara en las tres especies y se expresara sólo en cerdos (102).

Recientemente, la construcción de dos genes fueron microinyectados en óvulos fertilizados de oveja, estos genes fueron designados para dirigir la síntesis del factor IX de la coagulación y la alfa-1-antitripsina humana en la glándula mamaria, para su posterior secreción en la leche de la oveja. Se obtuvieron seis animales transgé-

nicos y en tres de ellos se demostró la transmisión de los genes a su progenie. Los animales transgénicos portadores de estos genes podrían al fin proporcionar una nueva fuente de proteínas terapéuticas útiles al hombre, a parte de los beneficios que puede aportar en el mejoramiento del ganado cuando esta se aplique a bovinos y cerdos (42,79,179,222).

#### Producción de productos farmacéuticos:

Existen estimaciones de que en un corto tiempo el impacto de la tecnología del ADN recombinante para producir productos farmacéuticos será muy grande, por lo que las ganancias económicas se pueden estimar en varios millones de dólares. Sin embargo, el prodigioso descubrimiento de obtener un microorganismo programado para producir una sustancia deseable, es sólo un pequeño paso en un gran proceso en el cual ocurre el desarrollo farmacéutico (17,96,161,195,253).

Actualmente, se han logrado avances considerables en el aislamiento, caracterización y clonación de los genes que codifican para productos humanos como: insulina, ~~hormona del crecimiento~~, somatotropina, plasminógeno, calcitonina, factor VIII de la coagulación, interleucina y factor del crecimiento epidérmico, entre otros (34,66,104,130,135,183,201,223,245,254,261).

Unos pocos productos veterinarios producidos por ingeniería genética están ya en el mercado y muchos más están en proceso de investigación y desarrollo, a continuación se mencionan algunos de ellos (89):

Moduladores del sistema inmune: a) Interleucina-2, desarrollada como un agente preventivo para enfermedades inespecíficas comunes en el ganado y con buenos resultados para tratar herpesvirus bovino I, virus de la parainfluenza 3 y virus cincitial respiratorio (43,53,85,89,244). b) Interferones, todos los tipos de interferones (15 en humanos) son capaces de reducir la severidad de las infecciones virales por que interfieren en la replicación de un amplio espectro de

virus, por lo que son una buena promesa para tratar enfermedades como; fiebre de embarque, rinotraqueitis viral bovina, virus de la parainfluenza 3 y diarrea viral bovina (además, actúan en pocas horas después de la inyección) (43,89,144,188,201,244). c) Adyuvantes, son investigados por su efectividad en terapias de cáncer en humanos y mostraron su poder en sistemas animales, en este caso, existe un producto usado para tratar tumores en el ganado bovino mediante la inyección directa del producto en el tumor (el tumor desaparece en pocas semanas (43)).

Antibióticos: esta comúnmente aceptado que muchos brotes de enfermedades devastadoras ocurren porque los antibióticos son inefectivos para controlarlos o limitar su severidad. Con el uso de la tecnología del ADN recombinante se podrán producir antibióticos más efectivos (17,86,174,195).

Otros: existen otros productos que podrían ayudar en gran forma a la producción de ganado bovino y porcino. Por ejemplo, vitaminas, aditivos y aminoácidos (173,174).

#### Complejo principal de histocompatibilidad:

Se denomina complejo principal de histocompatibilidad (CPH) al conjunto de genes estructurales codominantes (complejo génico) localizados en una región del cromosoma y que codifican para los antígenos principales de histocompatibilidad (APH). Los APH están localizados en la superficie de todas las células del organismo y en las de la respuesta inmunitaria. Los APH se heredan en base a un complejo génico en el cual hay tres clases importantes de loci: los de clase I, codifican para las moléculas presentes en la superficie de casi todas las células y son los antígenos blanco de las reacciones de rechazo, los de clase II, son genes que regulan la proliferación de linfocitos y la intensidad de la respuesta inmune y los de clase III, son genes que rigen la producción de algunos componentes del complemento. Es de particular importancia hacer notar que los antígenos de clase I y

II juegan un papel importante en la resistencia o susceptibilidad de los animales a las enfermedades. Por esta razón, el CPH ha recibido una atención considerable para estudiar el papel que juegan estos genes en la regulación de la respuesta inmunitaria y en la interacciones de las células linfoides (21,24,27,108,154,168,178,244,247).

El CPH ha sido definido en 12 especies de mamíferos, incluyendo a cerdos y bovinos. Estos, se han definido principalmente por el uso de técnicas serológicas (antígenos serologicamente definidos), por el uso de técnicas basadas en la linfotoxicidad (linfocíticamente definidos), por el uso de técnicas inmunoquímicas y por el uso de los anticuerpos monoclonales (10,11,21,63,73,131,170,<sup>(21,3)</sup>230,232,246,247).

Con el uso de la ingeniería genética molecular se puede comprender mucho acerca de los mecanismos de regulación del CPH y por lo tanto, de los factores involucrados en la resistencia a enfermedades y la forma en que estos se heredan, para establecer futuros programas de selección. Por medio de la combinación de cortes con enzimas de restricción de las moléculas de ADN y la técnica de hibridización tipo Southern, ha sido posible explorar los sitios polimórficos de reconocimiento del CPH del bovino y del cerdo, usando como detectores genes del CPH del hombre y del ratón. Los PLFR pueden ser sustitutos de la tipificación por tejidos cuando estos son difíciles o imposibles de realizar. También es posible asignar localizaciones precisas en el cromosoma fijado en metafase por medio de la técnica de hibridización in situ; por ejemplo, se ha asignado una localización preliminar del CPH en el cromosoma 23 del bovino y una localización definitiva en el cromosoma 7 del cerdo (14,15,54,55,75,84,199,248).

El análisis del ADN recombinante ha afectado profundamente las investigaciones inmunológicas, igual importancia está dirigida a los genes del CPH para explicar los fenómenos que constituyen la inmunología celular (170,191,252). (169) (151)

Estudios biológicos:

Por medio de la tecnología del ADN recombinante es posible realizar estudios en el genoma de cualquier organismo, esto ayudará en gran forma a una mejor comprensión de su estructura y función. El conocimiento generado de esta forma podrá, de alguna forma, ayudar a mejorar la producción de ganado bovino y porcino, como se presenta en los siguientes ejemplos.

Manipulación del rumen: debido a que la principal función del rumen es la fermentación de los carbohidratos y la degradación de las proteínas, una investigación razonable para mejorar su producción puede ser manipulando, por medio de la ingeniería genética molecular, en forma racional el ecosistema ruminal, para promover la multiplicación de bacterias y protozoarios deseables en lugar de los indeseables (163).

Estudios taxonómicos: por medio de la tecnología del ADN recombinante es posible situar, con elevada certeza, en su escala filogenética prácticamente a cualquier especie. Por ejemplo, en un amplio estudio en aves, se les reubicó filogenéticamente en nuevos grupos en los que, con las técnicas convencionales, no hubiese podido siquiera imaginarse. Otros ejemplos son: clasificación del panda gigante, chimpancé, gorila y cuaga (extinto miembro de la familia Equidae<sup>1</sup>) a los que se les sitúa en una escala filogénica más apropiada mediante el uso de técnicas de hibridización de sus genomas. De la misma manera se pueden realizar estudios en bovinos, cerdos y todas las demás especies domésticas y salvajes que habitan en nuestro planeta (94,107,187,221).

Ferohormonas y neuropéptidos: la producción de ferohormonas y neuropéptidos para el control biorracional de insectos que afectan la producción agrícola, significa una posibilidad potencial para controlar insectos que afectan al ganado bovino y porcino (44).

<sup>1</sup> El ADN fué obtenido de porciones del músculo encontradas en fósiles de un espécimen de museo.

Regulación de la tecnología del ADN recombinante:

Obviamente, los beneficios del uso de la ingeniería genética molecular son enormes, pero el peligro potencial que significa manipular genéticamente a los organismos es muy grande. Por esta razón, existen agrupaciones internacionales que regulan esta actividad básicamente en aspectos como:

- Examinar sistemas de drenaje y aerosoles que puedan servir como medios para la diseminación de microorganismos producidos por ingeniería genética.
- Evaluar el potencial de los efectos que pueden tener estos microorganismos en el medio ambiente.
- Desarrollar un plan de investigación para examinar la relación entre sobrevivencia, colonización, potencial de cambio genético, diseminación y efectos de estos microorganismos (38,89,123,128,132).



## ANALISIS DE LA INFORMACION

Para la elaboración del presente trabajo se revisaron 268 referencias, observandose que las publicaciones referentes a este tema abundan y que siguen incrementandose notablemente. Esto refleja el creciente interés que existe sobre la ingeniería genética del cual el médico veterinario zootecnista debe tomar parte importante.

El hecho que se puedan aislar fragmentos específicos de ADN e insertarlos en forma funcional en el genoma de cualquier organismo, abre una gran cantidad de posibilidades experimentales que, llevadas a gran escala con la ayuda de la biotecnología pueden culminar en la producción de gran cantidad de productos útiles al hombre y a los animales, muchos de ellos con enormes ventajas de los producidos por métodos convencionales. Por ejemplo, como se presentó en el presente trabajo, la producción de agentes de diagnóstico, vacunas, productos farmacéuticos y por último, si se puede considerar como un producto, la producción de animales transgénicos.

Los logros obtenidos en otras áreas benefician en forma directa la producción de ganado bovino y porcino con el desarrollo de nuevas y mejores técnicas de análisis y manipulación del genoma. De esta manera, ha sido posible incrementar el conocimiento que existe sobre la composición genética del ganado bovino y porcino para, en un momento dado, aplicarlo en técnicas de selección y cruzamiento, para analizar y manipular el complejo principal de histocompatibilidad (responsable en gran medida de la resistencia de los animales a las enfermedades) o para hacer estudios biológicos diversos.

Sin duda alguna, la ingeniería genética se encuentra en la frontera del conocimiento y puede proporcionar grandes beneficios, pero no deja de preocupar que esta sea utilizada para la autodestrucción del género humano (aparte del riesgo biológico que implica la realización de los experimentos) o que se constituya en una caja de Pandora en la que algún descubrimiento pueda desatar alguna revolución social, política, ética o moral.

El impacto que la ingeniería genética esta teniendo en la socie-

dad es evidente. Sin embargo, las expectativas que se vislumbran para el futuro son de dimensiones mucho mayores y debe corresponder a los investigadores alertar de los posibles riesgos que sus descubrimientos puedan generar.

## GLUCARIC

ADN repetitivo: Secuencia de nucleótidos que está presente repetidamente en el ADN cromosómico y está caracterizada por: el número de pares de bases por secuencia, el orden específico de los pares de bases por secuencia y el número de copias de una secuencia por genoma. Parece ser que este ADN se transcribe muy poco, o nada, dentro de la célula.

Alelo: Formas alternativas de un gen en particular como resultado de una mutación génica.

Bandas y sub-bandas: Son franjas de colorante que toman los cromosomas fijados en metafase después de teñirlos, básicamente con la tinción de Giemsa; cada banda está definida en relación a las bandas vecinas y separadas de ellas por regiones que se llaman inter-bandas o sub-bandas. Sirven para la identificación de los cromosomas por que tienen un diseño definido y dimensiones características.

Cápside: Es la cubierta proteica de una partícula vírica o virión que puede tomar formas diferentes (helicoidal o isométrica).

Células epigenéticas: Células a partir de las cuales se diferencian y desarrollan otras células de un organismo.

Cola poli (A): En los extremos de la molécula de ARN existe una secuencia nucleotídica formada por repeticiones de alguna de las cuatro bases nitrogenadas. En el ARN mensajero la base que generalmente corresponde es la adenina (A).

Denaturalización: Es la pérdida de la configuración nativa de una macromolécula que resulte de un tratamiento específico (por ejemplo, tratamiento con calor en la denaturalización térmica). En la molécula de ADN, al denaturalizarse con calor, se separan las cadenas quedando las bases sin aparearse; estas cadenas se pueden reunir para renaturalizar una molécula de ADN bajo condiciones apropiadas. También se puede renaturalizar una molécula de ADN con dos cadenas de diferente origen si comparten homología en su secuencia de bases, en el procedi-

miento llamado hibridización.

**Detector:** Secuencia específica de ADN de una sola cadena marcada radioactivamente (usualmente con fosfato 32 o con tritio), esta secuencia se usa principalmente para hibridizarse con otras y detectar a aquella con la que comparte homología en su secuencia de bases, al observarlas en una placa auto radiográfica.

**Epitopes:** Regiones antigénicas externas de un microorganismo capaces de producir una reacción antígeno-anticuerpo y contra las que va dirigida la respuesta inmune.

**Exones:** Secuencias de ADN que pueden ser transcritas a ARN y que codifican para algún producto o función celular.

**Fase lítica:** Fase en la que la multiplicación del bacteriofago lleva a la destrucción de la bacteria huésped.

**Genes estructurales:** Genes que codifican para polipéptidos.

**Hibridización celular:** En sentido amplio hibridización es cualquier apareamiento (cruzamiento) de dos individuos genéticamente distintos que lleva a la formación de descendencia híbrida. En los híbridos celulares somáticos una especie parateral es dominante y ocurre segregación por la pérdida de los cromosomas de una de las células parenterales (células padre), esto hace que estas células sean particularmente apropiadas para el análisis genético.

**Hibridización de ácidos nucleicos:** Es la unión de dos cadenas de ADN o ARN de diferente origen, una de ellas generalmente está marcada radioactivamente. La unión se realiza por el restablecimiento de los enlaces puente de hidrógeno entre bases complementarias.

**Intrones:** En organismos superiores, son secuencias de ADN que no codifican y actúan interrumpiendo la secuencia de los genes que sí codifican.

**Lisógeno:** Es la capacidad de los fagos de reproducirse en el genoma.

LITERATURA CITADA

- 1.- Abelson, J.: A revolution in biology. Sci., 209: 1321-1324 (1980).
- 2.- Abelson, P. H.: Biotechnology: an overview. Sci., 219: 611-613 (1983).
- 3.- Acha, P. N. y Szyfres, B.: Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud, O. M. S., Washington D C, U.S.A., 1977.
- 4.- Adams, T. E., Brando, R. and Morris, B.: The potential of the I region of the bovine major histocompatibility complex. Anim. Blood Groups Biochem. Genet., 10: 155-163 (1979).
- 5.- Agabian, N., Thomashoco, L., Milhuasen, M. and Stuart, K.: Structural analysis of variant and invariant genes in trypanosomes. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29: 1043-1049 (1980).
- 6.- Aho, E., Murphy, G. and Cannon, J.: Distribution of specific DNA sequences among pathogenic and comensal Neisseria species. Infect. Immun., 55: 1009-1013 (1987).
- 7.- Ainsworth, A. J. and Capley, G.: Monoclonal antibodies produced to Streptococcus agalactiae. Am. J. Vet. Res., 47: 1211-1213 (1986).
- 8.- Alan, J. and Morrison, I.: Alloimmune and MHC-restricted bovine cytotoxic cells. Anim. Blood Groups Biochem. Genet., 16: 115 (1985).
- 9.- Allison, A.: Vaccine technology developmental strategies. Bio/tech., 5: 1033-1040 (1987).
- 10.- Amorena, B. and Stone, W. H.: Serologically defined (SD) locus in cattle. Sci., 201: 159-160 (1978).
- 11.- Amorena, B. and Stone, W. H.: Sources of bovine lymphocytes antigen (BoLA) typing reagents. Anim. Blood Groups Biochem. Genet., 13: 81-90 (1982).
- 12.- Anderson, W. F., Killos, L. and Diacumakos, E. G.: Replication and expression of thymidine kinase human globin genes microinjected into mouse fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci., 77: 5399

5403 (1980).

- 13.- Anderson, F. N. and Diacumakos, E.G.: Genetic engineering in mammalian cells. Sci. Am., 245: 60-93 (1981).
- 14.- Anderson, L., Böhme, J., Ras, K. I. and Peterson, P. A.: Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes: 1. Extensive polymorphisms of DQ and DQ genes. Anim. Genet., 17: 95-112 (1986).
- 15.- Anderson, L., Böhme, J. and Ras, L.: Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes: 2. Polymorphism of DR genes and linkage disequilibrium in the DQ-DR region. Anim. Genet., 17: 295-304 (1986).
- 16.- Andino, R. A., Torres, H. N., Polacino, P. S., Schudel, A. and Palma, E. L.: Detection of bovine herpesvirus-1 nucleic acid sequences, using a dot-blot hybridization procedure. Am. J. Vet. Res., 48: 984-987 (1987).
- 17.- Anoronowitz, Y. and Cohen, G.: The microbiological production of pharmaceuticals. Sci. Am., 245: 141-143 (1981).
- 18.- Antczak, H. L.: Monoclonal antibodies: technology and potential use. J. Am. Vet. Med. Assoc., 181: 1005-1010 (1982).
- 19.- Avers, J. C.: genetics, P. W. S. Publishers, U.S.A., 1986. *Boston, Massachusetts Massachusett's*
- 20.- Ayala, F. J.: Genetic polymorphism: from electrophoresis to DNA sequences. Experientia, 39: 813-823 (1983).
- 21.- Bach, J. F. and Lesavre, P.: Immunology, Masson, *Barcelona* España 1981.
- 22.- Bachrach, L. H.: Recombinant DNA technology for the preparation of subunit vaccines. J. Am. Vet. Assoc., 181: 992-999 (1982).
- 23.- Barbet, A., Palmer, G., Miller, P. and Mcguiret, T.: Characterization of an immunoprotective protein complex of Anaplasma marginale by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Aml05L. Infect. Immun., 55: 2428-2435 (1987).
- 24.- Barret, J. T.: Immunología, inmunoquímica e inmunobiología. 4<sup>a</sup>. ed., Interamericana, México D. F., 1985.
- 25.- Beckmann, J. S., Kashi, Y., Hallerman, E. M., Nave, A. and

- Soller, M.: Restriction fragment length polymorphism among Israeli Holstein Friesian dairy bulls. Anim. Genet., 17: 25-38 (1986).
- 26.- Beckmann, J. S. and Soller, M.: Molecular markers in the genetic improvement of farm animals. Bio/tech. 5: 573-576 (1987).
- 27.- Bellanti, J. A.: Inmunología II, 2<sup>a</sup> ed., Nueva Editorial Interamericana, México, 1984.
- 28.- Berg, H. C.: Bovine-like rhodopsin in algae photoreception. Nature, 311: 702 (1984).
- 29.- Bhat, S. J. and Spector, A.: Complete nucleotide sequence of a cDNA derived from calf lens gamma-crystallin mRNA: presence of Alu-like DNA sequences. DNA, 3: 287-295 (1984).
- 30.- Bittle, J. L., Houghton, R. A. and Sutcliffeland, R. A.: Protection against foot and mouth disease by immunization with chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. Nature, 298: 30-33 (1982).
- 31.- Bittle, J. L., Worrell, P. and Lerner, A.: Immunization against foot and mouth disease with a chemically synthesized peptide. <sup>In</sup> Modern Approaches to vaccines. Edited by: Chanock, R. M. and Lerner, K., 103-107, Cold Spring Harbor Lab., New York U.S.A. 1984.
- 32.- Black, W. J. and Cannon, J. G.: Cloning of gonococcal DNA directing the synthesis of a pathogenic Neisseria common antigen. Abstracts of the Annual Meeting of Microbiology. Edited by: Nerdhardt, F., 60 D6, Board, New Orleans, U.S.A., 1983.
- 33.- Bolívar, F.: Ingeniería genética molecular. Ciencia, 31: 155-163 (1980).
- 34.- Bolívar, F.: Ingeniería genética molecular, <sup>En</sup> Transplante y movilización de genes. Editado por: Ondarza, R. N., Robert, M., Bolívar, F., 113-130, CONACYT, México, 1981
- 35.- Bolívar, F.: Alternativas para el diseño de vacunas por ingeniería genética, <sup>En</sup> Avances en el uso de vacunas 1985-1985. Edita-

- do por: Garza, R. J., 66-70, Gerencia general de biológicos y reactivos, Secretaría de Salud, México, D. F., 1986.
- 36.- Borst, P., Frasch, A. and Cross, M.: The genes for variant antigens in trypanosomes. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29: 1033-1036 (1980).
- 37.- Eren, F., Graf, F. and Frensdorff, H.: Genetic and economic differences among methods of gene conservation in farm animals. Liv. Prod. Sci., 11: 65-68 (1984).
- 38.- Brenner, S.: Six months in category four. Nature, 276: 2-4 (1978).
- 39.- Bricker, J., Mulks, H. and Plaut, A.: Cloning of Haemophilus influenzae IGA protease. Abstracts of the Annual Meeting of Microbiology 1983. Edited by: Nerdhardt, F., 59 D4, Board, U.S.A., 1983.
- 40.- Brown, F.: Synthetic viral vaccines. Annual Reviews of Microbiology. Edited by: Paul, W., Garrison, C., vol. 3, 321-325, Annual Reviews, U.S.A., 1984.
- 41.- Brown, F.: Summary. Vaccines 86. Edited by: Brown, F., Channoc, R., Lerner, R., 401-406, Cold Spring Harbor Lab., U.S.A., 1986.
- 42.- Bruere, A. N.: The future use of cytogenetics in the manipulation of domestic animal population. New Zeal. Vet. J., 23: 295-298 (1975).
- 43.- Brunt, V. J.: Bringing biotech to animal health care. Bio/tech, 5: 677-683 (1987).
- 44.- Brunt, V. J.: Pheromones and neuropeptides for biorational insect control. Bio/tech, 5: 31-45 (1987).
- 45.- Burk, D., Stanberg, J., Young, E. and Smith, K.: Clinical use of repetitive DNA. Recombinant DNA and Medical Genetics. Edited by: Messer, A., Porter, I., 195-198, Academic Press, U.S.A. 1983
- 46.- Calva, E.: El colifago lambda como vehiculo de clonación. Mensaje Bioquímico. Editado por: Saldaña, Y., Morales, S., Bruner, A., vol II, 87-101, Departamento de bioquímica, Facultad de Medicina,



- U.N.A.M., México, 1983.
- 47.- Calva, E. y Ayala, I.: DNA y RNA, metodología experimental básica. Mensaje bioquímico. Editado por: Saldaña, Y., Sandoval, F., Hamabata, A., vol VI, 353-373, Departamento de bioquímica, Facultad de Medicina, U.N.A.M., México, 1983.
  - 48.- Carlson, J. H.: Development and application of genetically engineered viral vaccines of poultry. Avian Dis., 30: 24-27 (1985).
  - 49.- Caruthers, M. H.: New chemical methods for synthesizing DNA and RNA. Biochem. Abst., 24: 3370 (1985).
  - 50.- Caskey, T. C.: Disease diagnostic by recombinant DNA methods. Sci., 236:1223-1228 (1987).
  - 51.- Cavenagh, D.: Monoclonal antibody and nucleic acid probes for the diagnosis of avian diseases. Avian Dis., 30: 12-18 (1985).
  - 52.- Celis, E.: Anticuerpos monoclonales. Mensaje Bioquímico. Editado por: Saldaña, Y., Morales, S., vol. V, 201-213, Departamento de bioquímica, Facultad de Medicina, U.N.A.M., México, 1983.
  - 53.- Coretti, P. and Mckerogan, K.: Cloning sequence and expression of bovine interleukin-2. Advances in gene technology: molecular biology of the endocrin system. Edited by: Pruett, D., vol. IV, 369-386, Cambridge University Press, U.S.A., 1986.
  - 54.- Chardon, P., Vaiman, M., Firszenbous, M., Geffroin, C., Bernard, C. and Cohen, D.: Restriction fragment length polymorphism of the major histocompatibility complex of the pig. Inmunogen., 21: 161-171 (1985).
  - 55.- Chardon, P., Vaiman, M. and Cohen, D.: Studies of MHC in farm animals by restriction enzyme polymorphisms. Abst. Anim. Genet. 17: 21 (1986).
  - 56.- Chen, C., Shull, B., Moses, E. and Baty, C: Complete nucleotide sequence and genome organization of bovine parvovirus. J. Virol 60: 1085-1097 (1986).
  - 57.- Christensen, K., Kaufmann, V. and Avery, B.: Chromosome mapping

- in domestic pig (Sus scrofa): MPl and NP located to chromosome 7. Hereditas, 102: 231-235 (1985).
- 58.- Cicilia, G., May, M., Morrrows, G. and Yoon, K.: Structure of the 3' portion of the bovine elastin gene. Biochem., 24: 3069-3073 (1985).
- 59.- Claverys, J. P., Lovarn, J. M. and Sicard, A. M.: Cloning of Streptococcus pneumoniae DNA: its use in pneumococcal transformation and its studies of mismatch repair. Gene, 13: 65-73 (1981a)
- 60.- Colver, T. E., Bowser, P. R. and Boyle, J. A.: Channel catfish virus: use of nucleic acids in studying viral relationship. Am. J. Vet. Res., 47: 2007-2011(1986).
- 61.- Collins, D. M. and Lisle, G. W.: Restriction endonuclease analysis of various strains of Mycobacterium paratuberculosis isolated from the cattle. Am. J. Vet. Res., 47: 2226-2229 (1986).
- 62.- Craig, R. K. and Hall, L.: Recombinant DNA technology: application to the characterization and expression of polypeptide hormones. Genetic engineering-4. Edited by: Williamson, R., 58-125, Academic Press, London, 1983.
- 63.- Cullen, D., Gregory, L., Norton, S. and Berica, N.: Controlled expression and secretion of bovine chymosin in Aspergillus nidulans. Bio/tech., 5: 369-376 (1987).
- 64.- Current topics: ASM news, 53: 263 (1987).
- 65.- Danforth, D. H. and Augustine, P. C.: Use of hibridoma antibodies and recombinant DNA technology in protozoan vaccines development Avian Dis., 30: 37-41 (1985)
- 66.- Davie, E. W. and Chang, L. W.: The cloning of blood coagulation factor. Genet. Abst., 17: No. 5756 (1985)
- 67.- Davis, B. and Dulbecco, R.: Microbiology, 3th. ed., Harper Row Publishers, U.S.A., 1980.
- 68.- De la Peña, M. J.: Movilización de DNA de Neurospora crassa a vehículos de clonación. Tesis de Licenciatura en Investigación

- Biomédica Básica. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1980.
- 69.- DeLisie, G. W., Peter, A. M., Walle, P. and Collins, D. M.: An examination of Campylobacter foetus subsp. foetus by restriction endonuclease analysis and serology. Vet Microbiol., 14: 53-60 (1987).
- 70.- Della Porta, A. J.: Current status of foot and mouth disease vaccines including the use of genetic engineering. Aust. Vet. J. 60: 129-134 (1983).
- 71.- Donis-Keller, H., Green, P., Helms, C., Cartinhour, S. and Brown, A.: A genetic linkage map of the human genome. Cell, 51: 319-337 (1987).
- 72.- Dougan, G. W., Sweeney, K. and Maskell, J. E.: Toxins as vaccine components. The impact of recombinant DNA technology. Genet. Abst., 20: No. 07 (1980).
- 73.- Duffy, J. H. and Outeridge, P.M.: Studies on the bovine lymphocyte antigens and the production of lymphocytotoxic antibodies by parous cattle. Anim. Blood Groups Biochem., 16: 83-92 (1985).
- 74.- Dunn, P. C., Blair, C. D., Ward, D. C. and Beaty, B. J.: Detection of bovine herpesvirus-specific nucleic acids by in situ hybridization with biotinylated DNA probes. Am. J. Vet. Res., 47: 740-746 (1986).
- 75.- Echard, G., Yerle, M., Gellin, J. and Gillois, M.: Assignment of the major histocompatibility complex to pl.4----gl.2 region of chromosome 7 in the pig (Sus scrofa domestica) by in situ hybridization. Cytog. and Cell Genet., 41: 126-128 (1986).
- 76.- Enquist, W.: Genetic engineering -1. Vet. Med. & Small Anim. Clin., 79: 689-692 (1984).
- 77.- Espejo, R.: Avances hacia vacunas sintéticas o recombinantes contra la diarrea por rotavirus. Avances en el uso de vacunas 1885-1935. Editado por: Garza R. J., 74-76, Gerencia General de Biológicos y Reactivos. Secretaría de Salud, México, 1986.

- 78.- Faras, A., Sadowski, P. and Halling, S.: The efficacy of bioengineered anti-toxyns and vaccines for animal health care, Advances in Gene technology, molecular genetics of plants and animals. Edited by: Downey, K., 495-502, Academic Press, U.S.A., 1983.
- 79.- Fochheimer, N.S.: Cytogenetics in animal production. J. Dairy Sci., 62: 844-853 (1979).
- 80.- Fitch, W. M., Smith, T.F. and Ralph, W. W.: Mapping the order of DNA restriction fragments. Gene, 22: 19-29 (1983).
- 81.- Flaherty, L.: Introduction to molecular genetics, Recombinant DNA and medical genetics. Edited by: Messer, A., Porter, H., 1-8, Academic Press, N. Y., U.S.A., 1983.
- 82.- Fox, J. L.: Three recombinant vaccine tests stir debate. Bio/Tech., 5: 13-14 (1987).
- 83.- Fox, J. L.: Plant, animal containment guides clarified. Bio/Tech., 5: 1127 (1987).
- 84.- Fries, R., Hediger, K. and Stranzinger, G.: Tentative chromosomal localization of the bovine major histocompatibility complex by in situ hybridization. Anim. Genet., 17: 287-294 (1986).
- 85.- Fulton, R. W., Burge, L. J. and McCracken, J. S.: Effect of recombinant DNA derived bovine and human interferon on replication of bovine herpesvirus -1, parainfluenza -3 and respiratory syncytial viruses. Am. J. Vet. Res., 47: 751-753 (1986).
- 86.- Gaden, E. L.: Production methods in industrial microbiology. Sci. Am., 245: 181-196 (1981).
- 87.- Galloway, D. R., Heldstrom, R. C. and Paulovskis, O. R.: Production and characterization of monoclonal antibodies to exotoxin a from Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun., 44: 262-267 (1984).
- 88.- Gamble, H. K. and Karlenga, D. S.: Biotechnology in the development of vaccines for animal parasites. Vet. Parasitol., 20: 237-250 (1986).
- 89.- Gibbs, J. N., Macker, H. and Marx, G.: Regulating bioengineering

veterinary drugs. Bio/Tech., 4: 414-416 (1986).

- 90.- Gill, A., Cowman, A., Stewart, N. and Kemp, D.; Variation in the molecular and biological characteristics of cloned lines of Babesia bovis, Colloquio du Centenaire, centenaire symposium Institut Pasteur 1987, molecular biology and infectious diseases, ~~Rowman's~~ communications abstracts. Edited by: Institut Pasteur, ~~Paris, France~~ <sup>Paris, France</sup>, 1987.
- 91.- Glasser, P. and Sezer, O.: Cloning of Bordetella pertussis adenylate cyclase gene and expression in Escherichia coli, <sup>In</sup> Colloquio du Centenaire, centenaire symposium Institut Pasteur 1987, molecular biology and infectious diseases, ~~Rowman's~~ <sup>Paris, France</sup> communications abstracts. Edited by: Institut Pasteur, ~~Paris, France~~, 1987.
- 92.- Goldsby, R., Srikantharaj, S., Nickerson, J. and Shapiro, P.: Hybridoma technology and its application to problems in veterinary research, <sup>In</sup> Genetic engineering -7, application to agriculture. Edited by: Owen, L. D., 107-133, Rowman & Allan Held Publishers, U.S.A., 1983.
- 93.- Goldsby, R.: Biotechnology: a selective survey. Avian Dis., 30: 3-10 (1985).
- 94.- Gómez, E. C.: Elementos transponibles en procariontes, <sup>En</sup> Mensaje bioquímico. Editado por: Saldana, Y., Morales, F., vol. V, 75-85, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.N.A.M., México, 1983.
- 95.- Gonzalez, F., Leachman, S., Norgard, M. and Hansen, E.: Cloning and expression in Escherichia coli of the gene encoding the heat-modifiable major outer membrane protein of Haemophilus influenzae tipe b. Infect. Immun., 55: 2993-3000 (1987).
- 96.- Gordon, J. W. and Ruddle, F.: Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. Methods Enzymol., 101: 411-413 (1983).
- 97.- Graessmann, M., and Graessmann, A.: Microinjection of tissue

- culture cells. Methods Enzymol., 101: 482-504 (1983).
- 98.- Graessmann, M. and Graessmann, A.: Gene manipulation and gene transfer into culture cells, Advances in gene technology, molecular genetics of plants and animals. Edited by: Downey, K., 395-399, Academic Press, U.S.A., 1983.
- 99.- Greenberg, H., Midthum, K., Wyatt, R. and Flores, J.: Use of reassortant rotaviruses and monoclonal antibodies to make gene-coding assignments and construct rotavirus vaccine candidates, Modern Approaches to Vaccines. Edited by Chanock, R. M., Lerner, K., 319-322, Cold Spring Harbor Lab., N. Y., U. S. A., 1984.
- 100.- Gutekunst, D. E.: Latent pseudorabies virus infection in swine detected by RNA-DNA hybridization. Am. J. Vet. Res., 40: 1568-1572 (1979).
- 101.- Haley, J., Hudson, P. and Shine, J.: Porcine relaxin: molecular cloning and cDNA structure. DMR., 1: 155-162 (1982).
- 102.- Hammer, R. E., Pursel, U. G., Ebert, K. J., Palmiter, R. D. and Brinster, R.: Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. Nature, 315: 680-683 (1985).
- 103.- Hampson, R. K. and Rottman, F. M.: Alternative processing of bovine growth hormone mRNA: nonsplicing of the final intron predicts a high molecular weight variant of bovine growth hormone. Proc. of the Natl. Acad. of Sci. U.S.A., 84: 2673-2677 (1987).
- 104.- Henderson, W.: The scientific and social impacts of recent advances in biotechnology. Vet. Rec., 115: 118-120 (1984).
- 105.- Herman, R. C. and Lazzarini, R. A.: Aberrant glycoprotein mRNA synthesized by the internal deletion mutant of vesicular stomatitis virus. J. Virol., 40: 78-86 (1981).
- 106.- Herman, R. C.: Aberrant mRNA synthesized by the internal deletion mutant of vesicular stomatitis virus, Recombinant DNA

- and medical genetics. Edited by: Meser, A., Porter, H., 203, Academic Press, N. Y., U.S.A., 1983.
- 107.- Higuchi, R., Bowman, B., Kayder, A. O., and Willson, C. A.: DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. Nature, 312: 282-284 (1984).
- 108.- Hoang-Xuan, M., Levezicel, H., Zilber, T., Paradi, L. and Levy, D.: Immunochemical characterization of major histocompatibility antigens in cattle. Inmunogen, 15: 207-211 (1982).
- 109.- Holman, J. P., Schuring, G. and Douglas, T. J.: Development of monoclonal antibodies to brucella cell surface antigens, Dw, Monoclonal antibodies against bacteria. Edited by: Macario, A. J., Macario, E. C., volume II, 81-109, Academic Press, London, 1986.
- 110.- Holmans, P. L., Loftus, T. A. and Hansen, E. J.: Cloning and surface expression in Escherichia coli of a structural gene encoding a surface protein of Haemophilus influenzae tipe b. Infect. Immunol., 50: 236-242 (1985).
- 111.- Hopwood, A. D.: The genetic programming of industrial microorganisms. Sci. Am., 245: 91-102 (1981).
- 112.- Howley, M. P., Sarver, H. and Law, M. F.: Eukariotic cloning vectors derived from bovine Papillomavirus DNA. Methods Enzymol., 101: 387-395 (1983).
- 113.- Hu, S. and Fox M. G.: Structural analysis of porcine parvovirus. Advances in gene technology. Molecular genetics of plants and animals. Edited by: Donway, K., 445-454, Academic Press, U.S.A., 1983.
- 114.- Hu, S., Bruszewski, J., Boone, T. and Souza, L.: Cloning and expression of the surface glycoprotein gp195 of porcine transmissible gastroenteritis virus. Modern Approaches to Vaccines. Edited by: Chanock, R. M., Lerner, K., 219-223, Cold Spring Harbor Lab., N. Y., U.S.A., 1984.

- 115.- Isaacson, R. E.: Cloning, mapping and expression of the Escherichia coli pillus-adhesin K99, Abstracts of the Annual Meeting of Microbiology. Edited by: Merdhardt, F., 60 DB, <sup>New Orleans</sup> Board, U.S.A., 1983.
- 116.- Isaacson, R. E.: Development of vaccines for bacterial diseases using recombinant DNA technology. Avian Dis., 30: (1), 28-35 (1985).
- 117.- Itakura, K. and Riggs, A. D.: Chemical DNA synthesis and recombinant DNA studies. Sci., 209: 1401-1405 (1980).
- 118.- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Nakanishi, S. and Numa, S.: Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dinorphin precursor. Nature, 298: 245-249 (1982).
- 119.- Kennedy, T. P., Evermann, J. F. and Chevers, W. P.: Restriction endonuclease patterns of bovine herpesvirus type 1 isolated from bovine mammary glands. Am. J. Vet. Res., 47: 2525-2529 (1986).
- 120.- Kerry, M. and Sundberg, J.: Papillomavirus genomes in experimentally induced fibromas white-tailed deer. Am. J. Vet. Res., 48: 1453 (1987).
- 121.- Keshet, E., Rosner, A., Gorecki, M. and Aviv, H.: Cloning of bovine growth hormone gene and its expression in bacteria. Nucl. Acid Res., 9: 19-29 (1981).
- 122.- Kieny, M. P., Lathé, R., Schmitt, D., Koprowski, N. and Lecoq, P.: Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. Nature, 312: 163-166 (1984).
- 123.- King, J.: New diseases in new niches. Nature, 276: 4-7 (1978).
- 124.- Kit, S.: Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of pseudorabies virus. Am. J. Vet. Res., 46: 1359-1367 (1985).
- 125.- Klausner, A.: Genetech's T-PA sales off and running. Bio/Tech.,



6: 119 (1988).

- 126.- K pper, H., Keller, W., Kurz, C. and Schaller, H.: Cloning of cDNA of major antigen of foot and mouth disease virus and expression in Escherichia coli. Nature, 289: 555-558 (1981).
- 127.- Land, H., Grez, M., Rupert, S. and Richter, D.: Deduced amino acid sequence from the bovine oxytocin-neurophysin I precursor cDNA. Nature, 302: 342-344 (1983).
- 128.- Lawrence, E.: Recombination: old and new. Nature, 276: 7 (1978)
- 129.- LeFavre, R. and Thiermann, B.: DNA homology studies of Leptospires of serogroups sejroe and pomona from cattle and swine. Am. J. Vet. Res., 47: 959-963 (1986).
- 130.- Leonard, W. J., Depper, J. M. and Greene, W. C.: Molecular cloning and expression of cDNA for the human interleukin -2 receptor. Nature, 311: 626-631 (1984).
- 131.- Letesson, J. J., Coppe, C. and Doppelchin, A.: Production and characterization of monoclonal antibodies raised against bovine class I alloantigens. Anim. Blood Groups Biochem. Genet., 16: 118 (1985).
- 132.- Levin, M. A., Seidler, R., Borquin, W. and Barkayt, A.: Developing methods to assess environmental release. Bio/tech., 5: 38-45 (1987).
- 133.- Levine, R. P.: Genética. Continental, México, 1974.
- 134.- Linemeyer, L., Kelly, L. and Kenneth, A.: Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for biologically active bovine acid fibroblast growth factor. Bio/tech., 5: 960-964 (1987).
- 135.- Lomedico, P. T., Gubler, V., Hellmann, P. C., Chua, A. O. and Mizel, S. B.: Cloning and expression of murine interleukine -1 cDNA in Escherichia coli. Nature, 312: 458-462 (1984).
- 136.- Lory, S. and Tai, P.: Characterization of the phospholipase C gene of Pseudomonas aeruginosa cloned in Escherichia coli. Gene, 22: 95-101 (1983).

- 137.- Lu, M., Becker, R., Buggs, A. and Young, R.: Genes for immunodominant protein antigens are highly homologous in Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium africanum and the vaccine strain Mycobacterium bovis BCG. Inf. Immun., 55: 2378-2382 (1987).
- 138.- Luchansky, J. B. and Pattee, P. A.: In vivo cloning of Tn551 insertions near markers of interest on the chromosome of Staphylococcus aureus, Abstracts of the Annual Meeting of Microbiology 1983. Edited by: Nerdhardt, T. F., 59 D6, Board, <sup>New Orleans</sup> U.S.A. 1983.
- 139.- Luck, D. N., Ngsee, J. K. and Smith, J.: Synthesis of bovine prolactin gene in Escherichia coli. DNA, 5: 21-28 (1986).
- 140.- Macario, A. J. and Conway E.: Introduction: monoclonal antibodies against bacteria for medicine, dentistry, veterinary, sciences, biotechnology, and industry- An overview, <sup>In:</sup> Monoclonal Antibodies Against Bacteria, vol. I xvii-xxxiii, Academic Press London, 1985.
- 141.- MacFarlan, R. I. and Koprowsky, H.: Localization of the immunodominant domains of rabies virus glycoprotein, <sup>In:</sup> Modern Approaches to Vaccines. Edited by: Chanock, R. M., Lerner, K., 139-143, Cold Spring Harbor Lab., N. Y., U.S.A., 1984.
- 142.- Mackett, M. and Smith, H.: A general method for the production and selection of vaccinia virus recombinants expressing foreign genes, <sup>In:</sup> Modern Approaches to Vaccines. Edited by: Chanock, R. M. and Lerner, K., 301-305, Cold Spring Harbor Lab., N. Y., U.S.A. 1984.
- 143.- Mackett, M., Yilmaz, T., Rose, K. and Moss, T.: Vaccinia virus recombinants: expression of VSV genes and protective immunization of mice and cattle. Sci., 227: 433-435 (1985).
- 144.- MacLachlan, N. J. and Aderson, K. P.: Effect of recombinant DNA-derived bovine alfa-1 interferon on transmissible gastroenteritis virus infection in swine. Am. J. Vet. Res., 47: 1149-1152 (1986).

- 145.- Macrina, F.: Molecular cloning of bacterial antigens and virulence determinants, Annual Reviews Microbiology. Edited by: Paul, W., Garrison, C., vol 38, 193-209, Annual Reviews, Cal., U.S.A., 1984. Foto AM. Cal.
- 146.- Maddox, W. C. and Wilson, R. A.: High technology diagnostics: detection of enterotoxigenic Escherichia coli, using DNA probes. Am. J. Vet. Res., 108: 57-59 (1986).
- 147.- Mainil, G. J., Bex, F. and Covturier, M.: Hybridization on bovine enterotoxigenic Escherichia coli with two heat-stable enterotoxin gene probes. Am. J. Vet. Res., 46: 2582-2584 (1985)
- 148.- Mainil, G. J., Moseley, S. L., Schnoider, A., Casey, T. and Moon, W.: Hybridization of bovine Escherichia coli isolated with gene probes for four enterotoxins (StaP, StaH, StL, LT) and one adhesion factor (K99). Am. J. Vet. Res., 47: 1145-1147 (1986).
- 149.- Malek, L. T., Garvin, R. T. and James, E.: The rabies glycoprotein gene is expressed in Escherichia coli as a denatured polypeptide, Modern Approaches to Vaccines. Edited by: Chanock, R. M., Lerner, K., Cold Spring Harbor Lab., N. Y., U.S.A., 1984.
- 150.- Marchioli, G. C., Yancey, R. J. and Post, L. E.: A vaccine strain of pseudorabies virus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein x genes. Am. J. Vet. Res., 48: 1577-1583 (1987).
- 151.- Marchitto, K., Smith, S., Loch, C. and Keith, J.: Nucleotide sequence homology to pertussis toxin gene in Bordetella bronchiseptica and Bordetella parapertussis. Inf. Imm., 55: 497-501 (1987).
- 152.- Marston, F. A., Lowe, P.A., Doel, M. T., Whites, G. and Angal, S.: Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in Escherichia coli. Bio/tech., 2: 800-804 (1984).
- 153.- Martin, D. W. and May, P.: Bioquímica de Harper. Manual Moderno, 12<sup>o</sup> ed., México, 1982.

- 154.- Marx, J. J.: Nobel Prize in Physiology or Medicine. Sci., 210: 621-623 (1980).
- 155.- Mc Donald, G.: Experimental vaccine for rocky mountain spotted fever. A.S.M. News, 53: 130 (1987).
- 156.- Mc Donald, G., Anacker, L. and Garjian, K.: Cloned gene of Rickettsia rickettsii surface antigen: Candidate vaccine for rocky mountain spotted fever. Sci. 235: 83-85 (1987).
- 157.- Mc Farlane, R. G., Thawley, D. G. and Solorzano, R. F.: Detection of latent pseudorabies virus in porcine tissue using a DNA Hybridization dot-blot assay. Am. J. Vet. Res., 47: 2329-2336 (1986).
- 158.- Mercken, L., Swillens, S., Massaer, M. and Vassart, G.: Primary structure of bovine thyroglobulin deduced from the sequence of its 8,431 base complementary DNA. Nature, 316: 647-650 (1985).
- 159.- Mercken, L., Simons, M. J. and Vassart, G.: Presence of homogenous and repetitive domains in the first 930 amino acids of bovine thyroglobulin as deduced from the cDNA sequence. Eur. J. Biochem., 147: 59-64 (1985).
- 160.- Miller, L. W., Martial, J. A. and Baxter J.: Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. J. Biol. Chem., 255: 7521-7524 (1980).
- 161.- Miller, H. I.: Designer genes for producing drugs: will they wash? DNA, 1: 101-102 (1982).
- 162.- Mock, M. and Glaser, P.: Cloning of Bacillus anthracis adenylate cyclase gene and its expression in Escherichia coli. Colloque du centenaire, centenaire symposium Institut Pasteur 1987, Molecular biology and infectious disease. Resumes Communications Abstracts. Edited by: Institut Pasteur, ~~Paris~~ <sup>Paris France</sup>, 1987.
- 163.- Mohan, T. S., Krishna, D. A. and Drajad, A.: Manipulation of rumen function through genetic engineering. Genet. Abst., 20: No. 115 (1988).

- 164.- Moir, J., Mao, J., Shum, J. and Taunton, A.: Molecular cloning and characterization of double-stranded cDNA coding for bovine Chymosin. Gene, 19: 127-138 (1982).
- 165.- Molitor, T. W. and Collet, H. S.: Porcine parvovirus DNA: Characterization of the genomic and replicative form DNA of two virus isolates. Virology, 137: 241-254 (1984).
- 166.- Moon, W. H., Shneider, A. R. and Moseley, S. L.: Comparative prevalence of four enterotoxin genes among Escherichia coli isolated from swine. Am. J. Vet. Res., 47: 210-212 (1986).
- 167.- Moore, D. M.: Production of a vaccine for food and mouth disease through gene cloning, Genetic Engineering 7, Applications to agriculture. Edited by: Owens, L., 89-106, Rowman & Allanheld Publishers, <sup>New Jersey</sup> U.S.A., 1987.
- 168.- Morling, N. Jakobsen, B. K., Platz, P., Ryder, L.P., Svejgaard, A. and Thomsen, M.: Typing for human alloantigen with the primed lymphocyte typing technique. Adv. Imm., 32: 66-156 (1980).
- 169.- Morrison, S. L.: Transfer and expression of immunoglobulin genes. Ann. Rev. Imm., 2: 239-256 (1984).
- 170.- Morrison, I. and Feale, A.: Mouse monoclonal antibodies detecting BoLA specificities. (Abstracts), Anim. Blood Groups, 16: 118 (1985).
- 171.- Mulligan, R. C. and Berg, P.: Expression of a bacterial gene in mammalian cells. Sci., 209: 1423-1435 (1980).
- 172.- Murray, P. K.: Prospects for molecular vaccines in veterinary parasitology. Vet. Parasitol., 25: 121-133 (1987).
- 173.- Muscoplat, C. C.: The impact of genetic engineering on animal health. Can. Vet. J., 25: 96-116 (1984).
- 174.- Muscoplat, C. C.: Genetic engineering -2: applications for animal health care. Vet. Med. & Small Anim. Clin., 79: 832-834 (1984).
- 175.- Nakanishi, S., Inoue, A. and Hama, S.: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor

- Nature, 278: 623-627 (1979).
- 176.- Nataro, J., Maher, K., Mackie, P. and Kaper, J.: Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic Escherichia coli. Inf. Imm., 55: 2370-2377 (1987).
- 177.- Nathans, J. and Hogness, D. S.: Isolation, sequence analysis and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. Cell, 34:807-814 (1983).
- 178.- Newman, M. J., Adams, T. E. and Brandon, M. R.: Serological and genetic identification of a bovine B lymphocyte alloantigen system. Anim. Blood Grps. Biochem Genet., 13: 123-139 (1982).
- 179.- Newmark, P.: Protein production in transgenic animals. Bio/Tech. 5: 374 (1987).
- 180.- News from the American Medical Association: Petition to block bovine growth hormone denied. J. Am. Vet. Med. Ass., 189: 1405 (1986).
- 181.- Nicholas, M. E.: Recombinant DNA techniques for vaccine production. Agric. Res., 28: 5-8 (1980).
- 182.- Nigal, L. and Smith, M.: A general method for defining restriction enzyme cleavage and recognition sites. Methods Enzymol., 65: 391-405 (1980).
- 183.- Nikaido, T., Shimizu, A. and Honjo, T.: Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. Nature, 311: 631-633 (1984).
- 184.- Noda, M. and Funtani, Y.: Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. Nature, 295: 202-206 (1982).
- 185.- Nojl, S., Date, S., Abiko, Y., Takiguchi, H. and Taniguchi, S.: Cloning and characterization of Streptococcus mutans LM7 plasmid pAM7. Infect. Immun., 55: 2533-2540 (1987).
- 186.- Oaks, E. W., Stover, K. and Rice, R. M.: Molecular cloning and expression of Rickettsia tsutsugamushi genes for two major protein antigens in Escherichia coli. Infect. Immun., 55: 1156-1162 (1987).

- 187.- O'Brien, S. J., Mash, W. G., Wildt, D. E. and Bencremista, R.: A molecular solution to the riddle of the giant panda's phylogeny. Nature, 317: 140-144 (1985).
- 188.- Office of Technical Assessment: U.S. Congress: rDNA, the future is here. Modern Vet. Pract., 63: 454-458 (1982).
- 189.- Osorio, F. A., Reed, D. E. and Metz, A.: Comparison of the herpesvirus of cattle by DNA restriction endonuclease analysis and serologic analysis. Am. J. Vet. Res., 46: 2104-2109 (1985).
- 190.- Patriarca, E., Sacco, M. and Moresca, B.: Gene expression during phase transition in the dimorphic pathogenic fungus Histoplasma capsulatum, Colloque du centenaire, Centenaire symposium Institut Pasteur 1987, molecular biology and infectious diseases, Resumés, Communications Abstracts. Edited by: Institut Pasteur. Paris, 1987.
- 191.- Pease, L. R., Nathanson, S. G. and Leinwand, L. A.: Mapping class I gene sequences in the major histocompatibility complex. Nature, 298: 382-385 (1982).
- 192.- Pellicer, A., Robins, D., Wold, B., Sweet, R., Roberts, J. M. and Axel, R.: Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer. Sci., 209: 1414-1421 (1980).
- 193.- Perkus, M. Piccini, A., Lipinkas, B. and Paoletti, E.: Recombinant vaccinia virus. Immunization against multiple pathogens. Sci., 229: 981-984 (1985).
- 194.- Perucho, M., Hanahan, D. and Wigier, M.: Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells, Cell, 22: 309-317 (1980).
- 195.- Phaff, H.: Industrial microorganisms. Sci. Am., 245: 77-89 (1981).
- 196.- Portugal, F. R., Jack, A. and Cohen, B.: A century of DNA. The MIT Press, Massachusetts Institute of Technology, U.S.A., 1977
- 197.- Puente, J. L., Flores, V., Fernandez, M., Fuch, Y. and Calva, E.: Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from

- Salmonella typhi*. Gene, 61: 75-83 (1987).
- 198.- Purchase, G. H.: Future applications of biotechnology in poultry. Avian Dis., 30: 49-59 (1985).
- 199.- Rabin, M., Fries, R., Singer, D. and Ruddle, F. H.: Assignment of the porcine major histocompatibility complex to chromosome 7 by in situ hybridization. Cytogen. Cell Genet., 39: 206-209 (1985).
- 200.- Rando, A. and Masina, P.: Restriction site polymorphisms in the pig beta globin gene cluster. Anim. Blood Grps. Bioch. Genet., 16: 35-40 (1985).
- 201.- Ratafia, M.: Mammalian cell culture: worldwide activities and markets. Bio/Tech., 5: 692-694 (1987).
- 202.- Reeve, J.: Selective expression of transduced or cloned DNA in minicells containing plasmid pKB230. Nature, 276: 728-729 (1978)
- 203.- Renard, J. P.: Methods of conserving gametes and embryos of farm mammals. Liv. Prod. Sci., 11: 49-59 (1984).
- 204.- Rieger, R., Michaelis, A. and Green, M. M.: Diccionario de genética y citogenética clásica y molecular, Alhambra Mexicana, México, 1982.
- 205.- Robinson, A. J.: The effect of molecular biology on vaccine development. New Zeal. Vet. J., 34: 41-42 (1986).
- 206.- Rose, J. K. and Shafferman, A.: Conditional expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein gene in Escherichia coli Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73: 6670-6674 (1981).
- 207.- Rowlands, D. J., Clarke, B. E. and Brown, F.: Chemical basis for variation in the major antigenic site eliciting neutralizing antibodies in foot-and-mouth disease virus. <sup>v</sup>Modern Approaches to vaccines. Edited by: Chanock, R. M. and Lerner, K., 93-101, Cold Spring Harbor Lab., N. Y., U.S.A., 1984.
- 208.- Ruddle, F. H.: Gene transfer and genome organization. <sup>Ex</sup>Transplante y movilización de genes. Editado por: Ondarza, R. N., Rober, M. y Bolívar, F. 137-144, CONACYT, México, 1981.



- 209.- Ruff, M., Snyder, D. and Sharma, J.: Proceedings of the symposium on biotechnology in the diagnosis and control of diseases of poultry. Avian Dis., 30: 1-3 (1985).
- 210.- Rylatt, D. B., Wyatt, D. M. and Burdese, P.: A competitive enzyme immunoassay for the detection of bovine antibodies to Brucella abortus using monoclonal antibodies. Vet. Immun. Immunopathol., 8: 261-271 (1985).
- 211.- Rzina, H. J., Mettenleiter, T. C., Lukacs, N. and Wittmann, G.: Studies on Aujeszky's disease using recombinant DNA technology, Nuclear and related techniques in animal production and health. Proceedings of a symposium, Vienna, 17-21, 329-340 (1986).
- 212.- Sambrook, J. and Gething, M. J.: Expression of proteins on the cell surface using mammalian vectors. Experimental manipulation of gene expression. Edited by: Masayoni, I, Academic Press, Florida, U.S.A., 1983.
- 213.- Sandoz, C. and Lazary, S.: Serological and MHC study on the BoLA system in young swiss bulls. (abstracts) Anim. Blood Grps., 16: 116 (1985).
- 214.- Sassavage, N. L., Nilson, J. H., Horowitz, J. H. and Rottman, F. M.: Nucleotide sequence of bovine prolactin messenger RNA. J. Biol. Chem., 257: 678-681 (1982).
- 215.- Scangos, G. and Ruddle, F. H.: Mechanisms and applications of DNA mediated gene transfer in mammalian cells - a review. Gene, 14: 1-10 (1981).
- 216.- Schoneweis, D. A. and Henry, S.: Theory and practice of immunoprophylaxis in swine. J. Am. Vet. Med. Ass., 181: 1154-1157 (1982).
- 217.- Sherman, D. M., Acres, D. and Muncoplat, C. C.: Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered Escherichia coli K-99-specific monoclonal antibody. Infect. Immun., 42: 653-658 (1983).
- 218.- Sherman, D. M.: Genetic engineering-3: monoclonal antibodies

- for veterinary medicine. Vet. Med. & Small Anim. Clin., 79: 959-964 (1984).
- 219.- Sherman, D. M. and Markham, J. F.: Current and future applications of monoclonal antibodies against bacteria in veterinary medicine. <sup>in</sup> Monoclonal antibodies against bacteria. Edited by: Macario, A. J. and Macario, E. C., 295-304, Vol. III, Academic Press, London, 1986.
- 220.- Shows, T. B., Zabel, B. V. and Tricoli, J. V.: High resolution chromosome mapping of cloned genes and DNA polymorphisms. <sup>in</sup> Recombinant DNA and medical genetics. Edited by: Messer, A, and Porter, H. I., 79-96, Academic Press, N. Y., U.S.A., 1983.
- 221.- Sibley, C. G. and Ahlquist, E. J.: Reconstruction bird phylogeny by comparing DNA's. Sci. Am., 250: 68-73 (1986).
- 222.- Simons, P. J., Wilmut, I., Clark, A. J. and Bishop, J. O.: Gene transfer into sheep. Bio/Tech., 6: 179-183 (1988).
- 223.- Singer, M. F.: Recombinant DNA revisited. Sci., 209: 3 (1980).
- 224.- Smith, G. L. and Moss, B.: Vaccinia virus recombinants expressing genes from pathogenic agents have potential as live vaccines. <sup>in</sup> Modern approaches to vaccines. Edited by: Chanok, R. M. and Kerner, K., 313-317, Cold Spring Harbor Lab., N.Y., U.S.A., 1984.
- 225.- Soberón, M. F.: Caracterización de un vehículo molecular de clonación: el plásmido pBR 325, Tesis de Licenciatura, Universidad Iberoamericana, México, D. F., 1979.
- 226.- Soberón, X.: Síntesis química de DNA e ingeniería genética. <sup>En</sup> Prospectiva de la biotecnología en México. Editado por: Fundación Javier Barros Sierra, 435-444, CONACYT, México, 1985.
- 227.- Soller, M.: The use of loci associated with quantitative effects in dairy cattle improvement. Anim. Prod., 27: 133-138 (1978).
- 228.- Soller, M. and Beckmann, J. S.: Restriction fragment length polymorphisms in poultry breeding. Poult. Sci., 65: 1474-1488

(1986).

- 229.- Spire, M. F.: Theory and practice of immunoprophylaxis in cattle. J. Am. Vet. Med. Ass., 181: 1158-1161 (1982).
- 230.- Spooner, R. L. and Teale, A. J.: Generation of cytotoxic T lymphocytes directed against bovine MHC products. (Abstracts) Anim. Blood Grps., 16: 114 (1985).
- 231.- Squire, K. R., Chvang, R. Y., Dunn, S. J. and Osbrun, G.: Multiple bluetongue virus cloned genetic probes: application to diagnostics and bluetongue virus genetics relationships. Am. J. Vet. Res., 47: 1785-1788 (1986).
- 232.- Stear, M. J., Lyons, I., Dufty, H., Nicholas, W. and Brown, C.: A comparison of bovine lymphocyte antigens. Anim. Blood Grps. Biochem. Genet., 16: 135-143 (1985).
- 233.- Steel, C. M.: DNA in medicine: The tools, part I. Lancet, 908-911 (1984).
- 234.- Steel, C. M.: DNA in medicine: The tools part II. Lancet, 966-968 (1984).
- 235.- Stewart, A. F., Willis, M. and Mackinlay, A. G.: Nucleotide sequences of bovine alfa s1- y  $\kappa$ -casein cDNAs. Nucl. Acid Res., 12: 3895-3902 (1984).
- 236.- Stewart, A. G., Richards, H., Roberts, S. and Derbyshire, C.: Cloning and expression of a porcine prorelaxin in Escherichia coli. Nucl. Acid Res., 11: 6597-6609 (1983).
- 237.- Stewart, B.: Biochemical studies of bovine herpes virus 1 DNA: chromatin structure of infected cells restriction endonuclease analysis of virus DNA and nucleic acids homology between isolates. Dis. Abst. Int., 47: 19738 (1986).
- 238.- Strickberger, M. W.: Genética, OMEGA, Barcelona, España, 1974.
- 239.- Swaminathan, M. S.: Agricultural Production; DNA in medicine. Lancet, 1329-1332 (1984).
- 240.- Tabares, S.: Detection of DNA viruses by radioactive and non radioactive E.A. probes: Application to african swine fever

- virus. Arch. Virol., 92: 233-242 (1987).
- 241.- Tamarin, R. H.: Principles of genetics, PWS Publishers, U.S.A., 1982.
- 242.- Thomas, P. S.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 5201-5205 (1980).
- 243.- Timmins, K. N.: Gene manipulation in vitro, <sup>Enl</sup> Genetics as a tool in microbiology. Edited by: Glover, S. W. and Hopwood, A., 49-86, Cambridge University Press, U.S.A., 1981.
- 244.- Tizard, I.: Immunología Veterinaria. Interamericana. México, 1984.
- 245.- Toole, J., Khopot, J., Jultzman, L., Buckner, J. and Hewich, M.: Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. Nature, 312: 342-347 (1984).
- 246.- Usinger, W. R., Curie, C. and Stone, W. H.: Lymphocyte-defined loci in cattle. Sci., 196: 1017-1018 (1977).
- 247.- Usinger, W. R., Curie, C., Bonforado, K. and Rowe, R.: The bovine major histocompatibility complex (BoLA) close linkage of the genes controlling serologically defined antigens and mixed lymphocyte reactivity. Immunogen., 14: 423-428 (1981).
- 248.- Vaiman, M., Chardon, P. and Cohen, D.: DNA polymorphism in the major histocompatibility complex of man and various animals. Anim. Genet., 17: 113-114 (1986).
- 249.- Vasil, M. L. and Berka, R. M.: Molecular characterization of cloned phosphate-regulated virulence genes of Pseudomonas aeruginosa. Abstracts of the Annual Meeting of Microbiology. Edited by: Heidhardt, F., SDDI, Board, U.S.A., 1983.
- 250.- Vasseghi, H. and Claveris, J. P.: Amplification of a chimeric plasmid carrying an erythromycin-resistance determinant introduced into the genome of Streptococcus pneumoniae. Gene, 21: 285-292 (1983).
- 251.- Wanger, A. R. and Dunny, G. E.: Development of a system for

- genetic and molecular analysis of Streptococcus agalactiae.  
Res. Vet. Sci., 38: 202-208 (1985).
- 252.- Watson, D.: Biología molecular del Gen. 3<sup>a</sup> ed., Fondo Educativo Interamericano, España, 1976.
- 253.- Watson, D., Tooze, J. and Kurtz, D.: Recombinant DNA, a short course, Scientific American Book, N.Y., U.S.A. 1983.
- 254.- Weatherall, D. J.: DNA in medicine, Implications for medical practice and human biology. Lancet, 1440-1444 (1984).
- 255.- Whetstone, C. A., Wheeler, J. G. and Reed, D. E.: Investigation of possible vaccine-induced epizootics of infectious bovine rhinotracheitis using restriction endonuclease analysis of viral DNA. Am. J. Vet. Res., 47: 1789-1795 (1986).
- 256.- White, R., Barker, D., Cavenee, W. and Leppert, M.: Approaches to human genetics based on DNA sequence polymorphism. <sup>In:</sup> Recombinant DNA and medical genetics. Edited by: Messer, A. and Porter H. I., 73-77, Academic Press, N.Y., U.S.A., 1983.
- 257.- White, R.: DNA in medicine, human genetics. Lancet, 1257-1262 (1984).
- 258.- Wilkitor, T. J., Lafon, M. and Wunner, W.: Recognition of antigenic variants of rabies virus by monoclonal antibodies. <sup>In:</sup> Advances in gene technology, Molecular genetics of plants and animals. Edited by: Lowney, K., 455-465, Academic Press, N.Y., U.S.A., 1983.
- 259.- Williams, R.: Genetic manipulation- potential medical and veterinary benefits. Brit. Vet. J., 136: 516-518 (1980).
- 260.- Wolpert, L.: DNA in medicine: DNA and its message. Lancet, 853-856 (1984).
- 261.- Wood, W., Capon, J., Simonsen, G., Eaton, D. L., Vehar, G. A. and Lawn, R.: Expression of active human factor VIII from a recombinant DNA clones. Nature, 312: 330-336 (1984).
- 262.- Workman, E.: The next generation of in-clinic diagnostics, Vet. Med., 82: 559-562 (1987).

- 263.- Woychick, R. P., Camper, S. A. and Rottman, F. M.: Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. Nucl. Acid Res., 10: 7197-7210 (1982).
- 264.- Wunner, W. H., Dietzhold, B., Curtis, P. J. and Wilkitor, T. J.: Rabies subunit vaccines. Advances in gene technology, Molecular genetics of plants and animals. Edited by: Downey, K., 467-477 Academic Press, U.S.A., 1983.
- 265.- Yansura, D. G., Dowbenko, D. and Kleid, D. G.: Biosynthetic vaccine for foot-and-mouth disease. Advances in gene technology Molecular genetics of plants and animals. Edited by: Downey, K., 479-493, Academic Press, U.S.A., 1983.
- 266.- Yelverton, E., Horton, S., Obijeski, F. and Goeddel, D.: Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in Escherichia coli. Sci., 219: 614-620 (1983).
- 267.- Young, R. A., Bloom, B. R. and Davis, R. W.: Dissertation of Mycobacterium tuberculosis antigens using recombinant DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 32: 2583-2587 (1985).
- 268.- Young, D. B., Kent, L. and Young, R. A.: Screening of a recombinant mycobacterial DNA library with polyclonal antiserum and molecular weight analysis of expressed antigens. Infect. Immun. 55: 1421-1425 (1987).