



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO MOLECULAR PARA
LA DETERMINACIÓN DE LA PATERNIDAD EN CABRAS
MEDIANTE EL USO DE MARCADORES GENÉTICOS:

TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

OSCAR JACOBO DIMAS

ASESOR: Dr. MIGUEL ÁNGEL PÉREZ RAZO

COASESORES: Dra. LUCÍA ANGÉLICA GARCÍA CAMACHO

Dr. JOSÉ DE LUCAS TRON

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme la oportunidad de culminar con esta etapa, a si como la capacidad de vencer cada obstáculo para poder compartir la dicha de este logro con todos mis seres queridos.

A mis padres por todos los esfuerzos y paciencia, este trabajo este trabajo se los dedico a ustedes que han estado siempre a mi lado apoyándome
GRACIAS.

A cada uno de mis hermanos por el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida y que ha sido fundamental en los logros que e obtenido

A mis asesores que me brindaron las herramientas para realizar este trabajo

ÍNDICE

Resumen	1
I Introducción	2
I.1. Antecedentes	2
I.2. Importancia de conocer la paternidad	2
I.3 Métodos de identificación más usados en las cabras	2
I.4. Métodos de diagnóstico de paternidad	3
I.4.1. Uso de grupos sanguíneos en cabras	3
I.4.2. Importancia de los marcadores en el uso de PCR	4
I.5. Técnica de PCR	5
I.5.1 Tipos de PCR utilizados en pruebas de paternidad	7
I.6. Secuenciación de alelos	8
I.7 Antecedentes del uso de PCR en pruebas de paternidad	8
I.7.1 Uso de PCR en el diagnóstico de la paternidad de los animales domésticos	9
I.7.1.1 Perros	9
I.7.1.2 Porcinos	9
I.7.1.3 Ovinos y Bovinos	10
I.7.1.4. Cabras	10
I.7.1.5. Uso de PCR en la detección de genes de importancia productiva	11
II. Objetivos	12
II.1. Objetivo general	12
II.2 Objetivos particulares	12
III Material y Métodos	13
3.1 Diseño experimental	13
3.2 Extracción de ADN	13
3.3 Amplificación por PCR	14
3.4 Visualización de alelos en gel de Agarosa	14

IV Resultados	17
V Discusión	23
VI Conclusión	27
VII literatura citada	28

RESUMEN

La determinación de la paternidad es relevante en la evaluación del perfil genético de los rebaños con la finalidad de establecer un control del parentesco e incluso en la presencia de apareamientos consanguíneos. De esta forma nos facilita la implementación de programas de mejoramiento genético. En la actualidad, la prueba de paternidad se puede realizar mediante la utilización de marcadores genéticos. Con la finalidad de estandarizar una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se determinaron las condiciones óptimas para la amplificación de 3 marcadores genéticos: INRA011, SR-CRP-1 y SR-CRSP-5. Se utilizaron 15 grupos familiares de raza *Alpina Francesa* pertenecientes al rebaño albergado en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. A los animales de estudio se les tomaron muestra sanguíneas para la extracción de ADN, el cual se utilizó en la estandarización de la PCR. Para los tres marcadores, se determinó que la concentración óptima de $MgCl_2$ en la mezcla de PCR fue de 1.5 mM y que la temperatura óptima de alineación fue de 57°C. Así mismo, la visualización adecuada de alelos se obtuvo mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% durante 2:30 horas. Los productos detectados en los geles de agarosa permitieron *a priori* detectar relaciones de parentesco de las crías con sus respectivos padres utilizados y se observó concordancia entre los tres marcadores empleados. Sin embargo, la determinación final de la paternidad requiere la secuenciación de los alelos obtenidos en el presente trabajo. Los resultados preliminares sugieren que el uso los marcadores evaluados pueden ser de gran utilidad en programas de identificación de paternidad para el mejoramiento genético de los rebaños.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ANTECEDENTES

I.2. Importancia de conocer la paternidad

Desde que el hombre domesticó a los animales, se dio cuenta que al aparear a estos, las crías tenían parecido algunos al padre y otros a la madre, y estas similitudes hacían que los hijos se comportaran productivamente muy similares a uno de los padres. Es por ello que basados en esta idea el hombre, escogía a los padres cuyas características quería que heredasen las crías (Jiménez., 2012), manejo que poco a poco se fue transformado en lo que hoy conocemos como programas de mejoramiento genético.

Debido a que el mercado mundial exige una mayor producción y calidad de alimentos de origen animal, se han establecido en los países diversos programas de mejoramiento genético que permiten alcanzar estas metas (De-Sousa *et al.*, 2011). En la actualidad en la industria animal en la mayoría de los programas de crianza, se seleccionan para pie de cría a aquellos animales que poseen las características deseadas para la producción (Oskan *et al.*, 2009). Todos estos conceptos son relevantes ya que los animales seleccionados serán utilizados como transmisores de sus genes.

En los programas de selección existen varios requisitos que son indispensables. El primero indica que todos los animales deben de estar insertados dentro de una estructura familiar, el segundo es tener un registro correcto, y el tercero la perfecta identificación desde el nacimiento, para poder así llevar un control de su pedigrí, de su productividad, así como de su rendimiento económico (Johan y Van Arendonk., 2011). Por tal motivo, el productor y la industria animal se han preocupado en encontrar un sistema que les proporcione la certeza de que el registro pertenece a un animal en especial (Albert *et al.*, 1994), ya que una pérdida de su identificación equivale en algunas ocasiones a la pérdida total de los registros del individuo. Adicionalmente, la identificación correcta del animal es de utilidad en otros momentos, como por ejemplo, para establecer la propiedad del animal y constituye una herramienta esencial en los programas sanitarios y reproductivos, en éste último para considerar qué hembras con qué machos se van a aparear (Leboeuf *et al.*, 1998).

I.3. Métodos de identificación más usados en las cabras

Entre los métodos de identificación animal, se pueden clasificar en naturales y artificiales y, por la permanencia del carácter, en permanentes o temporales. Entre los de tipo natural pueden señalarse algunos como el color o dibujos de la capa y actualmente su ADN (Ácido desoxirribonucleico), y entre los artificiales destacan el uso de aretes, chips y tatuajes (Jiménez., 2012). Para la utilización de los métodos artificiales se requiere del uso de un sistema numérico efectivo, si toda la información es correcta, se puede tener una buena estructura familiar en donde se conocen quienes son los padres o los hijos. Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofrecen cualquiera de éstas tres formas de identificación, pueden fallar, por ejemplo; cuando el número grabado en el arete se pierde, o cuando el arete es arrancado en su totalidad por otra cabra, o por instalaciones inadecuadas. Otra falla, que no es inherente a estas formas de identificación, se relaciona con la pérdida de identificación del animal cuando muchas hembras paren simultáneamente. En estos casos puede suceder un intercambio de las crías, lo que promueve un error en el registro al momento de determinar quiénes son los padres, situación que seguramente conducirá a errores en la selección (De-Sousa *et al.*, 2011).

En respuesta a estas limitantes, se han generado nuevas formas de corroborar la identificación de animales utilizando metodologías moleculares. Estas metodologías permiten garantizar la identidad de los animales a través del análisis de su ADN mediante la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (Jiménez *et al.*, 2006) (Jiménez C., 2012). Esta metodología ha sido utilizada en la determinación de la paternidad en ganado bovino mediante la identificación de genes que determinan características productivas, como el de la hormona gonadotropina (GH) la cual está relacionada con la producción de leche (Barrera *et al.*, 2010).

I.4. Métodos de diagnóstico de paternidad

I.4.1. Uso de grupos sanguíneos en cabras

Hasta el momento, no existe mucha información en relación a los distintos grupos sanguíneos presentes en las cabras. Esto se debe a que en la clínica o en el quehacer diario de las producciones caprinas no se emplean con frecuencia las transfusiones sanguíneas como sucede en otras especies, específicamente perros, gatos y caballos. Este aspecto ha limitado el interés por seguir investigando los grupos sanguíneos en cabras. Debido a que

los ovinos y los caprinos presentan grupos sanguíneos muy similares, se han utilizado reactivos ovinos para demostrar la expresión de antígenos caprinos mediante marcadores de superficie eritrocitaria parcialmente solubles y receptores específicos determinados por un Sistema de Histocompatibilidad (Garzon *et al.*, 1976; Madueño y Morera., 1987). Los tipos sanguíneos que se conocen en las cabras son A, B, C, D, M y R. Es importante conocer la serotipificación de un animal para poder llevar a cabo una transfusión ya que si el individuo donante no es compatible con el receptor se presenta el fenómeno de rechazo, debido a que los eritrocitos expresan sustancias potencialmente antigénicas en su superficie. Por ello las sustancias antigénicas son las que le dan las características propias de cada grupo sanguíneo y que son transmitidos de padres a hijos, por esta razón al ser comparados el tipo sanguíneo de un individuo con el de sus padres y coincidir, se podía establecer su parentesco. Sin embargo, esta forma de identificación de la paternidad presenta grandes inconvenientes ya que en el mismo rebaño puede haber varios sementales que tengan el mismo grupo sanguíneo. (Madueño y Morera, 1987).

I.4.2. Importancia de los marcadores en el uso de la PCR

En la actualidad, la técnica más usada y confiable para la identificación de paternidad es la PCR debido a que la probabilidad de que 2 individuos posean la misma combinación de genes es casi nula, ya que es solo del 1 % (Pépin *et al.*, 1995; Boloimaa *et al.*, 2008). La paternidad mediante ésta metodología se basa en la presencia de secuencias de ADN que se repiten en varias partes del genoma y que no codifican para alguna característica fenotípica. Estas secuencias se les conocen como microsatélites que contienen unidades de 2 a 6 pares de base (pb) repetidas en tándem de 50 veces con tramos de longitud variable (100 a 300 pb). Por tal motivo, se les considera como la mayor fuente de polimorfismo que permite encontrar la huella genética (Albert *et al.*, 1994). La variación en el número de repeticiones en el ADN genera diferentes alelos. Dicha variabilidad es útil para su uso como marcadores moleculares en una gran variedad de aplicaciones. En el campo de la genética son de utilidad en la identificación de marcadores para establecer el mapa genético. En los ovinos y cabras se ha encontrado que los mapas genéticos de ambos son notablemente dispares en términos de integridad (Pitel y Riquet, 2000; Schibrer *et al.*, 2000). La mayoría de las investigaciones relacionadas con el diagnóstico de la paternidad

emplean varios marcadores, llegando algunos a la utilización de hasta 9 distintos marcadores (Arévalo *et al.*, 1999; Pépin *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 2006). Se conocen la existencia de 40 marcadores utilizados para este fin (Pépin *et al.*, 1995). Es importante mencionar que debido a la similitud genética que existe tanto en bovinos, ovinos y cabras, el uso de iniciadores empleados en bovinos, también se han aplicado en las cabras, como en el trabajo de (Pépin *et al.*, 1995). También es importante considerar el valor del **Contenido de Información Polimórfica** (PIC), debido a que ésta información indica la calidad de un marcador. Su valor depende del número de alelos y de la distribución de frecuencias. Valores superiores a 0.5 se consideran muy informativos, los valores entre 0.25 y 0.5 medianamente informativos y los valores inferiores a 0.25 poco informativos. (Rubén *et al.*, 2006). Actualmente no existe una metodología estandarizada con el uso de marcadores para la determinación de la paternidad en cabras. Sin embargo, algunos de los pasos que se deben de realizar para el uso de ésta metodología como prueba de paternidad son comunes a otras especies, por ejemplo: determinar a partir de que muestra se obtendrá el ADN, el cual generalmente se obtiene de sangre o de semen (Zajc y Simpson. 1996; Cstahlberg y Harlizius, 2000; Kokinen., 2001). Un siguiente paso a la obtención del DNA es la elección de las secuencias de ácido nucleico que se utilizarán como iniciadores para dar inicio a la replicación del ADN (Pépin *et al.*, 1995). Algunos de los marcadores más utilizados así como las secuencias de iniciadores y PIC se muestran en el Cuadro 1 (Arevalo *et al.*, 1999; Pépin *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 2006).

I.5. Técnica de la PCR

De forma natural, el proceso de replicación de ADN involucra una serie de reacciones enzimáticas con el fin de obtener una copia completa del genoma. Las enzimas primero separan la doble hélice de ADN para obtener cadenas sencillas. Después, la primasa (una ARN polimerasa), sintetiza pequeños fragmentos de ARN complementario de cada una de las cadenas de ADN en el sitio de inicio de la replicación. Este híbrido ADN/ARN actúa como sitio cebador para la unión de la ADN polimerasa la cual entonces produce una cadena de ADN complementaria (Murray *et al.*, 2001; Maddox y Cockett, 2007). Algo similar ocurre con el proceso de la PCR, en donde la reacción de PCR se desarrolla en tres fases.

Cuadro 1. Microsatélites más usados en el diagnóstico de la paternidad en cabras

Marcador	(5'-3')	PIC	Cromosoma	Alelos (bp) frecuencia	Tm
SR-CRSP-1	F: -TGCAAGAAGTTTTCCAGAGC- R: -GTACCCTGGTTTCACAAAAGG-	0.866	13 ^a	150 (0,036); 148 (0.0361); 146 (0.063); 0.950 0.866 50 144 (0.073); 142 (0.109); 140 (0.094); 138 (0.177); 136 10.125); 134 (0.167); 130 (0.120)	50
SR-CRSP-2	F-TGCTGTATCCTGTGTAATATCTT- R- GCATAAACAGATTATTGTGATGAT-	0.458	?	157 (0.055); 155 (0.143); 153 (0.044); 0.458 0.371 52 151 (0.758)	52
SR-CRSP-4	F-CTTCACCTCTACTCCCAGTCAA- R - CCTCCGACAAAAGGAATGTAGCCT-	0.311	?	263 (0.056); 259 (0.072); 257 (0.035); 249 (0.838)	48
SR-CRSP-5	F: - GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG- R: - TTATGAAATGAAGCTAAAGCAATG	0.806	21 ^a	180 (0.052); 174 (0.030); 172 (0,107);170 (0.2501; 168 (0.052); 166 (0.102); 164 (0.256); 160 (0,127); 158 (0.025)	55
INRA011c	F: -CCCTGCGCTCCACCAT- R: -TTGCCCTCTTTCTTTTCTAC	0.920	1a	?	55
ChirUCO2	F: -CCTGGGTCCCTGAAAGACT- R: -AAGGAAGCCCTTTCATTTCATT	0.765	?	?	?
ChirUCO4	F: - GATCATTCCAGTGCACCTACTAA- R: -GGGTGCAAAGGGTCAGA	0.678	?	?	?
ChirUCO5	F: - GCCTCAGGAAAAGACAAAAGTCAC- R: -GCACCTCCACCCCTTCATA	0.562	?	?	?
ETH10	F: - GTTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA- R: -CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	0.559	5b	?	?

Arevalo *et al.*, 1999

Pépin *et al.*, 1995

Temperatura de alineamiento (Tm)

Contenido de Información Polimórfica (PIC)

En la primera fase, se realiza la desnaturalización del ADN que se quiere amplificar a altas temperaturas (94°C). Lo anterior separa el ADN para que un par de iniciadores (con secuencias complementarias al templado) se alinee en cada una de las cadenas de acuerdo a una temperatura determinada con base en la secuencia de los iniciadores. Por último, se obtiene una copia de ADN durante el alargamiento que se realiza a una temperatura de 72°C. Así tras 20 ciclos de reacción se puede obtener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN (Murray *et al.*, 2001; Maddox y Cockett, 2007). Por lo que esta técnica permite amplificar *in vitro* rápida y eficientemente pequeñas cantidades de ADN y el producto que se obtiene al finalizar la reacción es una gran cantidad de un fragmento génico con alto grado de pureza. Un factor primordial para la eficiencia de la PCR es el diseño de iniciadores en el que se consideran el número de pares de bases, el contenido de guanina y citosina (G-C), para que se unan al ADN en la localización correcta así como una correcta manipulación de los reactivos (Ricaño *et al.*, 2007). Es importante tomar en cuenta que para el buen funcionamiento de los iniciadores se debe considerar la T_m (Temperatura de elongación) para determinar la temperatura de alineación y la concentración de $MgCl_2$ para establecer las condiciones de amplificación (Rubén *et al.*, 2006).

I.5.1 Tipos de PCR utilizados en pruebas de paternidad

PCR tradicional: Es una técnica de PCR de punto final en la que se amplifica un sólo molde con base a un número predeterminado de ciclos de amplificación para obtener un producto de un tamaño esperado con base al sitio de alineación de los iniciadores. Dicho producto es visualizado en el gel de agarosa posterior a la separación por medio de electroforesis. Los primeros estudios de amplificación de marcadores genéticos de paternidad se realizaron mediante el uso de esta modalidad. (Arévalo *et al.*, 1999; Pépin *et al.*, 1995)

PCR Múltiple: Es una metodología de fácil manejo que ofrece gran versatilidad. Con este tipo de PCR, se pueden determinar similitudes o diferencias entre individuos así como para la determinar diferencias genéticas entre especies. Por tal motivo es de gran utilidad en el diagnóstico de la paternidad. Otra aplicación consiste en la identificación y diagnóstico de distintos microorganismos patógenos. Tiene la ventaja de permitirnos detectar en un solo tubo de forma simultánea diferentes secuencias blanco, permitiendo la detección e

identificación de distintos genes de interés. En ésta metodología se utilizan 2 o más iniciadores y se puede evaluar en consecuencia 2 o más regiones en el ADN donde exista polimorfismo. Se puede amplificar cualquier porción de ácido nucleico conocido o no, siempre que quede comprendido entre dos secuencias conocidas con las que podrán hibridar varios oligonucleótidos complementarios (Longo *et al.*, 1990).

PCR de Tiempo real: Es una variante del PCR tradicional pero con la ventaja de ser más rápido debido a que los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Longo *et al.*, 1990). En la actualidad se cuentan con distintas metodologías para el diagnóstico de la paternidad, permitiendo tener un mayor número de opciones, ya que estas metodologías han demostrado dar buenos resultados (Ávila *et al.*, 1995).

I.6. Secuenciación de alelos

Independientemente de la técnica de amplificación utilizada, la secuenciación es fundamental para la determinación de alelos ya que la secuencia y número de bases amplificadas definirá el número de alelos presentes en la población evaluada. Para dicho efecto, los productos amplificados o las bandas recuperadas de un gel de agarosa son previamente purificados. En la actualidad, el método de purificación más utilizado es mediante el uso de columnas. Finalmente, la muestra es cuantificada por espectrometría. Las secuencias de los productos amplificados son comparadas mediante programas especializados como (GeneMapper v3.7 y Data collection v 1.0) para evaluar los polimorfismos (Ávila *et al.*, 1995). La metodología de la secuenciación dependerá del equipo empleado.

I.7. Antecedentes del uso de PCR en pruebas de paternidad

El uso de la PCR para el diagnóstico de paternidad así como para la identificación de genes en el hombre es una técnica comúnmente empleada y de mucha difusión debido a su

frecuente utilización con fines legales y penales. Esto ha permitido que esta técnica pueda ser utilizada en los animales para la identificación de genes o de la paternidad por ejemplo en animales de registro. Desde su creación en 1995, el mapa genético de los ovinos ha sido actualizado regularmente siendo la versión más reciente la publicada en junio de 2006 (Oskan *et al.*, 2009). En el transcurso de estos años se han descubierto los marcadores del genoma en los ovinos tanto de hembras como de los machos y en cuanto a la cabra solo se ha descubierto el genoma del macho actualizado por última vez en 1998 estos mapas se componen principalmente de marcadores anónimos de micro satélites, que se derivan de las secuencias del mapa de la oveja (Oskan *et al.*, 2009; Sevane *et al.*, 2010).

I.7.1 Uso de PCR en el diagnóstico de la paternidad de los animales domésticos

I.7.1.1 Perros

En el diagnóstico de la paternidad en perros se han utilizado entre 10 y 20 microsatélites (Zajc y Simpson, 1996; Kokinen., 2001). En algunos países como Argentina el diagnóstico de la paternidad es una herramienta que actualmente es muy utilizada en perros en los casos controvertidos de paternidad que se generan cuando un criadero vende un perro de determinada raza y los compradores tienen fundadas dudas sobre el verdadero origen del perro. Esto puede suceder porque el cachorro no es de raza pura, no es de la raza señalada o porque no es hijo de los perros que se indicaron como sus progenitores. Para solucionar esas situaciones, el criadero puede optar por realizar la prueba de ADN para despejar todas las dudas posibles. De este modo, la existencia de 20 microsatélites específicos de los perros ha permitido que se pueda realizar el diagnóstico de la paternidad que en esta especie tiene una alta confiabilidad y de este modo poder constatar su pedigrí (Zajc y Simpson, 1996).

I.7.1.2 Porcinos

En los cerdos, la PCR en el diagnóstico de la paternidad, se ha probado con embriones de 5 a 6 meses, mediante la amplificación de microsatélites (Cstathlberg y Harlizius., 2000). También a servido para el control del parentesco y diagnóstico de paternidad en cerdos australianos utilizando varios micro satélites (Nechtelberger *et al.*, 2001)

I.7.1.3 Ovinos y Bovinos

Usos similares de la PCR en ovinos y bovinos también han sido referidos. Por ejemplo en España con la raza ovina *Aragonesa*, se utilizaron 22 marcadores (Ferreira y Monteagudo, 1999). En México, se han utilizado con las principales razas ovinas registradas en la Unión Nacional de Ovinocultores (UNO) para el registro genético de pureza de los sementales para después hacer el diagnóstico de paternidad de sus descendientes. En esta prueba se utilizan 15 distintos marcadores (Jandurova *et al.*, 2006). En el ganado bovino, el uso del PCR ha identificado microsatélites específicos de esta especie, y en el diagnóstico de la paternidad se han utilizado desde 12 hasta 22 microsatélites (Vaiman *et al.*, 1996; Russel *et al.*, 2001; Dario *et al.*, 2006). En Inglaterra, la utilización de 94 microsatélites esta técnica se determinó una gran variación entre razas y rebaños en el ganado lechero (Visser *et al.*, 2010). Por otro lado en China, se utilizaron 20 microsatélites en bovinos y ovinos para la determinación de la variación genética entre 5 razas nativas de este país (Mellado *et al.*, 2000; Zhao y Yang, 2001).

I.7.1.4. Cabras

La mayoría de los marcadores en el mapa genético de la cabra también se han posicionado en el mapa genético de los ovinos, y muchos de los marcadores utilizados en ovinos y caprinos han sido también posicionados en los mapas de la especie bovina, es por ello que los mapas de las tres especies pueden ser fácilmente alineados. La utilización de marcadores genéticos en la actualidad es una práctica común con el fin de caracterizar una raza típica de una región, para la identificación de genes que le dan a esa cabra las características de adaptación a un medio ambiente y la resistencia a enfermedades propias de ese ecosistema para un mejor aprovechamiento y explotación (Acosta *et al.*, 2005).

También ha sido de gran utilidad para obtener el perfil genético en rebaños donde se han llevado apareamientos consanguíneos y no se ha tenido un buen control del parentesco en el rebaño, como sucedió con la cabra Blanca Andaluza por lo cual en el 2004 se tuvo que realizar un análisis de micro satélites del ADN, para determinar el parentesco (Martínez *et al.*, 2004). A diferencia de lo que sucede con las ovejas y las cabras, los bovinos han tenido actualizaciones más recientes en su mapa genético, la última fue en el 2010, probablemente esta diferencia se debe al interés que han tenido los productores en el uso de información

sobre el genotipo como una ayuda a la selección ya que puede ser una forma barata y eficaz para obtener el progreso genético de las razas en ganado bovino. (Martínez *et al.*, 2004).

En Brasil, esta técnica se empleó para determinar la paternidad de 292 cabras de tres razas diferentes *Alpina*, *Saanen* y *Moxoto*, utilizando un total de 276 casos de paternidad en los que solo se observó una tasa de error del 10% (Mello *et al.*, 2010). Los pocos trabajos realizados en las cabras han utilizado entre 5 y 11 microsatélites de los cuales la mayoría fueron probados inicialmente en bovinos. Dichos micro satélites posteriormente se utilizaron en cabras mediante el uso de PCR multiplex para el diagnóstico de la paternidad (Salinas Toldo *et al.*, 1993; Arevalo *et al.*, 1999; Luikart *et al.*, 1999, Jimenéz *et al.*, 2006). En un trabajo realizado en 6 rebaños Españoles de la raza *Granadina-Murciana* se probaron 9 microsatélites. La variabilidad general entre los marcadores fue alta, encontrándose un mayor número de alelos para el INRA011c (21 alelos). Con respecto a la variabilidad entre rebaños, no todos los alelos del mismo marcador estaban presentes en su totalidad en cada rebaño, y sólo se obtuvieron en los marcadores con bajo número de alelos (SR-CRSP-5, ChirUCO2, ChirUCO5 and ETH10) (Jimenéz *et al.*, 2006).

I.7.1.5. Otros usos de PCR en detección de genes de importancia productiva

Otro campo de investigación ha sido referente a aspectos relacionados con la calidad de la carne. En éste campo, se han usado marcadores genéticos para la identificación de los genes que regulan el marmoleo de la carne, la ganancia de peso, así como el crecimiento en bovinos productores de carne, en caso del ganado de leche se han buscado los genes que dan las altas producciones de leche así como la conformación general de la vaca como son los aplomos, la implantación de las ubres, capacidad torácica y todas las características que les ayudan a ser mejores productoras (Savane *et al.*, 2010)

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar una técnica de PCR para la detección de marcadores genéticos como prueba de paternidad en cabras

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la temperatura óptima de alineamiento para la amplificación de 3 marcadores genéticos (SR-CRSP-1, SR-CRSP-5 y INRA011c).
- Determinar la concentración óptima de $MgCl_2$ para la amplificación de 3 marcadores genéticos (SR-CRSP-1, SR-CRSP-5 y INRA011c).
- Determinar la concentración óptima de agarosa para la discriminación electroforética del tamaño de los alelos.
- Detección de los marcadores genéticos para ser empleados en el diagnóstico de la paternidad

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental

Se utilizaron dos sementales y 30 cabras (15 madres y 15 hijas) pertenecientes al rebaño de la posta de la FES-Cuautitlán la cual se localiza a los 19° 41'35'' de latitud Norte y 99° 10' longitud oeste a una altitud de 2400 m.s.n.m. El clima corresponde a C(Won)(W)b(i'); es decir templado el más seco de los subhúmedos con lluvias en verano e invierno seco. El régimen pluvial oscila entre 569 mm y la temperatura media anual es de 14.7°C con poca variación de temperatura relativa 67.9% evaporación 1.417.0mm presión atmosférica 585.1mmhg dirección del viento norte sur (INEGI 2010). Los animales fueron seleccionados con base al registro existente de sementales y de sus crías. A todos los animales del estudio, se les tomó una muestra de sangre (5ml) mediante extracción aséptica en la vena yugular, en un tubo vacutainer con EDTA, la muestra fue llevada al laboratorio de Patología Molecular Veterinaria, ubicado en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación de la FES-C para su procesamiento.

3.2 Extracción de ADN

Con la sangre completa obtenida en tubos con EDTA, se realizó la extracción de ADN por sistema presurizado (QuickGene-Mini80, FujifilmLifeScience) utilizando un kit comercial. Brevemente, en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml se agregaron 250 µl de buffer de Lisis (LDB) a los que se adicionaron 200 µl de sangre, se mezcló 5 veces por inversión y se agitó por 15 segundos (seg.) en un vortex (Vortex genic 2, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA). La mezcla se incubó a 56° C por 2 minutos (min) para agregar 250 µl de etanol absoluto (ETOH100) y agitar con vortex durante 15 seg. Posteriormente, el lisado se transfirió a una columna y por presurización se realizaron tres lavados con 750 µl del buffer de lavado (WDB), eliminando en cada paso el líquido filtrado. Finalmente, la columna se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se procedió al paso de elución utilizando 200 µl de buffer de elución (CDB). El ADN se cuantificó y evaluó mediante espectrofotometría (Nanodrop, Spectrophotometer ND-1000).

3, 3 Amplificación por PCR

Para la amplificación de los marcadores SR-CRSP-1 (SR1), SR-CRSP-5 (SR5) e INRA011c (INRA11) se utilizaron los iniciadores descritos en Tabla 2 procedentes de regiones altamente conservadas de los microsatélites referidos. Con base a la concentración de ADN e histogramas obtenidos en espectrofotómetro, se seleccionó una muestra de ADN de una cabrita y se ajustó a un rango de 50 ng/μl para realizar un tamiz de temperatura con base al promedio de la T_m de los iniciadores indicado tanto por el proveedor como por la T_m calculada de cada marcador seleccionado para la amplificación de alelos, utilizando una concentración estándar de $MgCl_2$ (1.5 mM). Posteriormente, se programó en el termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) un gradiente de temperatura considerando una temperatura de 57° C +/- 3° C para determinar la temperatura óptima de alineación para cada marcador (Tabla 3). La reacción de PCR se realizó a un volumen de 50μl conteniendo: 50 ng de templado, 100 pM de cada uno de los iniciadores (sentido y antisentido) por marcador, amortiguador de reacción de PCR 1X [KCl 500 mM, Tris - HCl 100mM (pH 9.0), y 1 % Triton X-100], 0.2 μM de cada dNTPs, 1.5 mM de $MgCl_2$, 5.0 unidades de Taq polimerasa (GoTaq, Promega Corp., Madison WI., USA) y agua grado biología molecular cbp 50 μl. Una vez seleccionada la temperatura de alineación para cada marcador, se probó una concentración adicional de $MgCl_2$ (2.0 mM). Las condiciones finales programadas en el termociclador se muestran en la Tabla 4.

3.4 Visualización de alelos en gel de Agarosa

La visualización de los productos de la PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa (Promega Corp., Madison WI., USA) al 1.5 % y 3.0 % en amortiguador TBE 1X (Promega Corp., Madison WI., USA) con bromuro de etidio (5μg/ml). La mezcla de agarosa a la concentración deseada, se disolvió en horno de microondas a potencia alta en ciclos de 30 segundos sin alcanzar ebullición hasta la completa disolución. Acto seguido, se agregó bromuro de etidio y se colocó en una cámara horizontal de electroforesis (Owl separation Systems, Inc. Portsmouth, NH, USA). La carga del gel se realizó como sigue: Se tomaron de 4 μl de producto de amplificación y se mezclaron con 4 μl del amortiguador de carga (Loading buffer, Promega Corp., Madison WI., USA) y la mezcla total se depositó en los pozos del gel de agarosa. En el primer carril consistentemente se cargaron 4 μl de marcador

de peso molecular (100 bp Markers, Promega Corp., Madison WI., USA) el cual se diluyó de la manera descrita. Posteriormente, se realizó electroforesis a 80 volts durante 60 minutos, 75 minutos, 90 minutos en los geles de 1.5% y por 2 horas y media en los geles de 3%. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Apollo, Instrumentation, Calif, USA). Los resultados de la electroforesis se documentaron usando el programa Doc-It Software (UVP, Cambridge UK) utilizando una cámara digital (Olympus camera, Tokyo, Japan).

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la amplificación de marcadores de paternidad

Marcador	Secuencias	Tamaño (pb)
SR-1		
Sentido	5'-TGC AAG AAG TTT TTC CAG AGC-3'	130-150 ¹
Anti-sentido	5'-GTA CCC TGG TTT CAC AAA AGG-3'	
SR-5		
Sentido	5'-GGA CTC TAC CAA CTG AGC TAC AAG-3'	158-180 ¹
Anti-sentido	5'-TTA TGA AAT GAA GCT AAA GCA ATG -3'	
INRA11		
Sentido	5'- CCC TGC GCT CCA CCA T-3'	112 -150 ^(2,3)
Anti-sentido	5'-TTG CCC CTC TTT CTT TTT CTA C-3'	

¹ Arévalo , *et al* (1994)

² GenBank (2013):

³ Pepín ,*et al* (1995)

Cuadro 3. Gradiente programado por el termociclador (58° C +/- 2.4 C)

○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
52	52.9	54.2*	54.9*	56*	56.9*	58.2*	58.9*	60*	60.9	62.2

* Temperaturas probadas para la estandarización de la PCR

Cuadro 4. Condiciones de amplificación para el Termociclador (vLEB)

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	CICLOS	REACCION
94	3	1	Desnaturalización Inicial
94	1	35	Desnaturalización
57	1	35	Alineación
72	1	35	Extensión
72	7	1	Extensión final
4			Conservación

IV RESULTADOS

De las muestras de sangre obtenidas de los animales en estudio se obtuvo ADN en las condiciones descritas por el fabricante (Fuji, Tokyo Japan) en un promedio de 30 ng/ μ l. Los productos obtenidos en el tamiz inicial de temperatura se muestran en la figura 1. Se apreció que en ambas temperaturas seleccionadas se obtuvieron productos de alrededor de 150 pb (flecha gruesa) y de aproximadamente 200 pb (flecha delgada) para los marcadores SR-1 y SR-5, respectivamente. Sin embargo, para el marcador IN11 no hubo amplificación a 54° C (asterisco) y sólo se amplificaron alelos sospechosos de aproximadamente 150 pb y 230 pb (corchete) a 56° C, en presencia de amplificaciones múltiples. Posteriormente, la amplificación de alelos para el marcador IN11 con base al gradiente de temperatura.

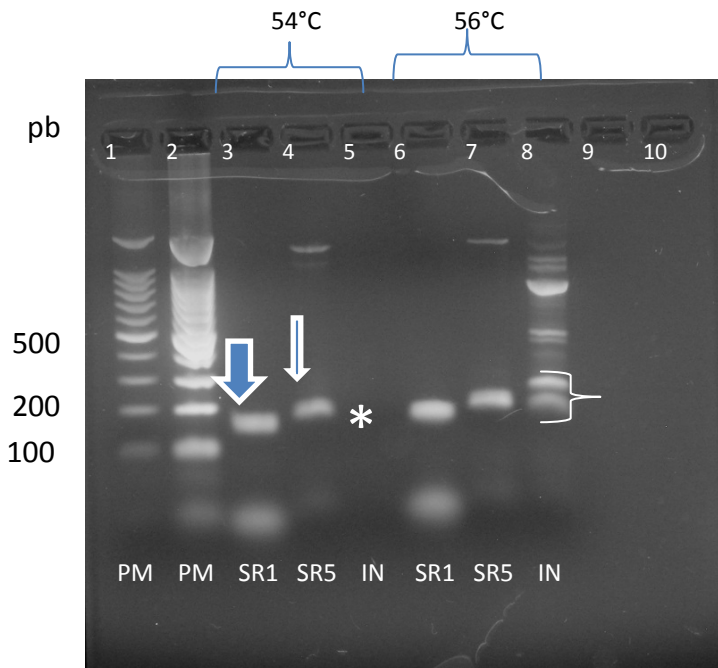


Figura 1. Amplificación de alelos de IN11, SR1 y SR5 utilizando temperaturas de alineación de 54° C y 56° C (Gel de agarosa al 1.5%, 1.5 mM de MgCl₂). Electroforesis: 60 minutos

(Figura 2) reveló nuevamente la amplificación de los alelos sospechosos de aproximadamente 150 pb y 230 pb a las temperaturas de 56, 57 y 58°C. Es importante apuntar que a las temperaturas referidas la amplificación del producto de 230 pb es menor que el de 150 pb, y que la temperatura de 57°C mostró una mejor amplificación de este último. La presencia de amplificaciones inespecíficas desaparece a 59 y 60°C pero sólo se amplifica el producto de 150 pb. Cabe señalar que se observó amplificación de alelos del mismo tamaño obtenido en la figura 1 para los marcadores SR-1 y SR-5 a 58° C y 60° C. Otro aspecto para mencionar es que en ambos marcadores se ve la presencia de dos alelos sobrepuestos que se observan con mayor detalle en los alelos de SR-5 a la temperatura de 58° C (asterisco). Por otro lado, el incremento en la concentración de MgCl₂ a 2 mM

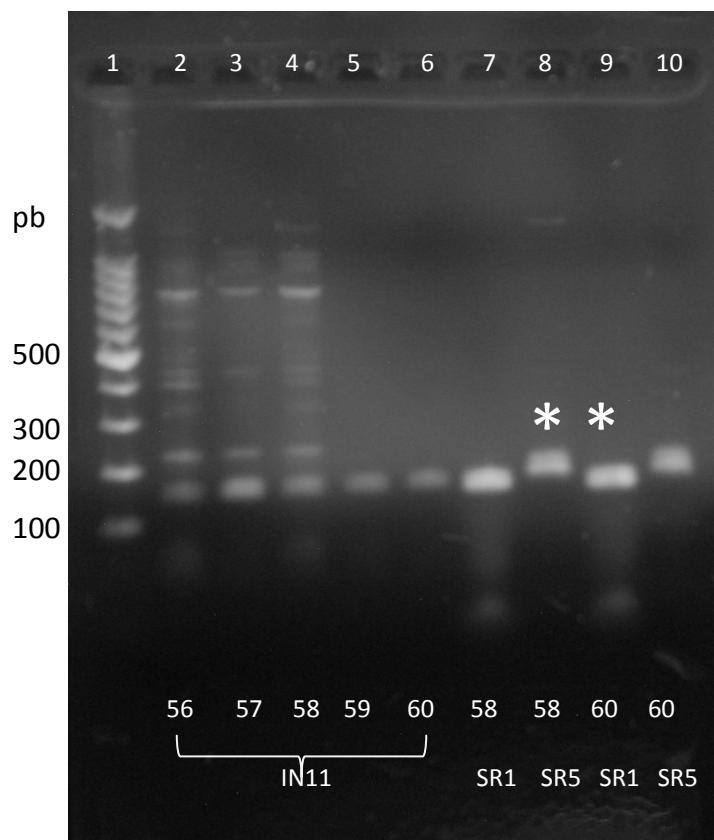


Figura 2. Amplificación de alelos de INRRA11 (IN11), utilizando un gradiente de temperatura. Adicionalmente, se muestra la amplificación de alelos de SR-CRSP-1(SR-) y SR-CRSP-5 (SR5) a temperaturas de 58° C y 60° C (Gel de agarosa al 1.5%, 1.5 mM de MgCl₂). Electroforesis: 75 minutos.

(Figura 3), no mejoró la eficiencia de la amplificación de ninguno de los marcadores debido a que la intensidad de las bandas fue menor. Por el contrario, en el caso de IN11, no se logró la amplificación del producto de 230 pb y el incremento tuvo el efecto negativo en la amplificación del alelo de 150 pb (cuadrado), mismo que se aprecia débilmente. Sin embargo, el mayor tiempo de electroforesis reveló con mayor detalle la presencia de 2 bandas, compatibles con la presencia de 2 alelos en todos los marcadores pero aún se aprecian muy cercanos separados por una pequeña línea ligeramente apreciable por ser de tamaño muy similar. En el caso de la amplificación en formato de PCR múltiple para los marcadores IN11 SR-1 y SR-5 sólo se amplificaron productos de aproximadamente 150 pb similares a los que se amplificaron para SR-CRSP1 en el formato tradicional (corchete). La comparación de las bandas del padre de la cabrita utilizada en las amplificaciones realizadas hasta el momento con los tres marcadores

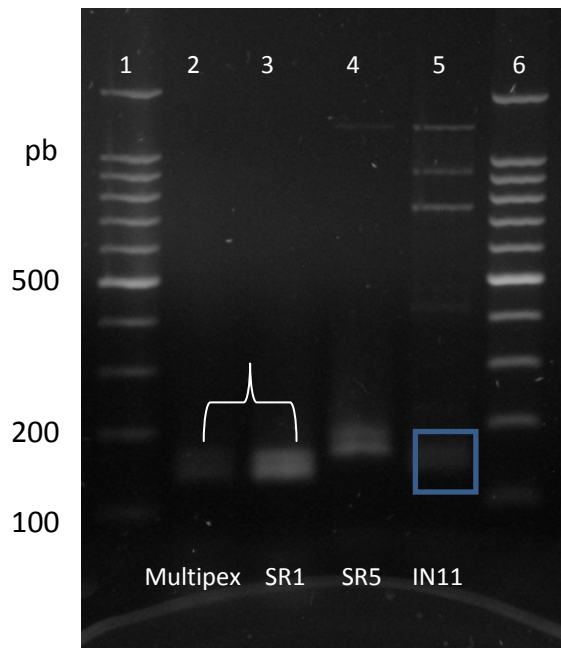


Figura 3. Amplificación de alelos de los marcadores IN11, SR-1 y SR-5 utilizando temperatura de alineación 60° C. (Gel de agarosa al 1.5%, 2 mM de MgCl₂). Electroforesis: 90 minutos

(Figura 4) reveló una concordancia de alelos entre el padre y la hija con base a los marcadores SR-1 y SR-5. En el marcador SR-1, tanto en el padre como en la hija, los alelos de 150 y 160 pb se aprecian como si fueran una sola banda (flecha gruesa), y con el marcador SR-5 se observan tanto para el padre como la hija dos alelos uno más tenue que el otro de aproximadamente 170 y 180 pb (enmarcado) separados ligeramente. Sin embargo, con el marcador IN11 los productos obtenidos fueron un tanto sospechosos, por un lado en el padre uno de los productos obtenidos fue de 230 pb y que se apreció débilmente en la hija. Por otro lado, en la hija se aprecian dos bandas débilmente separadas (flecha delgada) de alrededor de 150 pb y que en el padre estas bandas se observan muy débilmente.

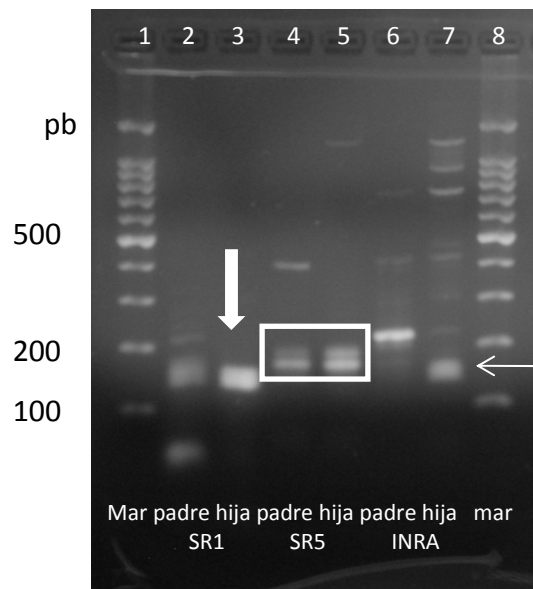


Figura 4. Amplificación de alelos de padre e hija SR1 y SR-5, utilizando temperatura de alineación 57° C y con el marcador IN11 a temperatura de 57° C (Gel de agarosa al 1.5%, 1.5 mM de MgCl₂). Electroforesis 90 minutos

En la Figura 5. Se muestran los resultados de la incorporación de la madre al pedigrí y utilizando los marcadores SR-1 y SR-5, como se puede observar aparecen las bandas de los tres miembros de la familia, correspondiendo a los tamaños de pb descritos anteriormente, de alrededor de 160 pb (SR-1 carriles 2-4) y 170-180 pb (SR5 carriles 5-7). Con el marcador SR1 tanto en el padre como en la hija aparecen un par de bandas similares, pero más tenues en el padre y solo una de ellas en la madre. En el marcador SR-5 también se ve un par de bandas correspondientes entre el padre y la hija y al igual que el marcador anterior se observan las dos bandas en la hija muy tenue y para la madre la aparición de una sola banda.

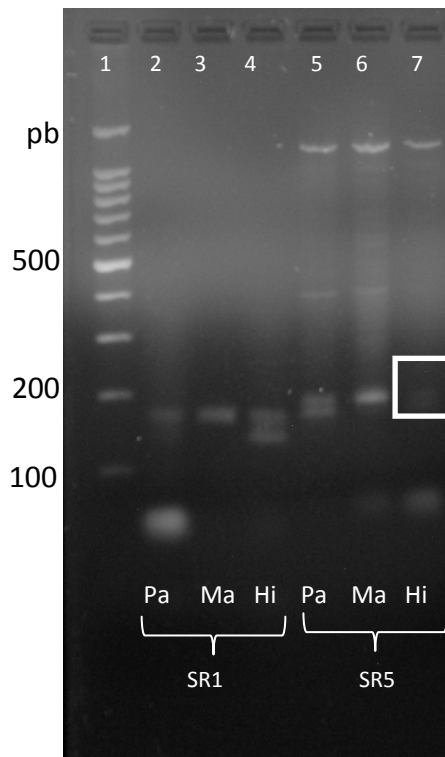


Figura 5. Amplificación de alelos de un producto de PCR con los marcadores SR-1 y SR-5. Temperatura de alineación 57°C (Gel de agarosa al 1.5%. 1.5 mM de Mg Cl₂). Electroforesis: 90 minutos.

A continuación en la Figura 6. Se observan los resultados de la utilización del marcador IN11, con dos pedigrís correspondientes a los 2 machos del rebaño (Figura 6). El primer pedigrí incluyó a Philip con una madre y su hija (carriles 2-4), y el segundo estuvo constituido por el Gringo con una madre, una hija y una nieta (carriles 5-8). Es importante señalar que el Gringo y su hija son los animales con los que se realizó la estandarización y cuyos alelos se presentan en la Figura 4. Para mejorar la visualización de los alelos descritos, se incrementó la concentración del gel de agarosa al 3% con un tiempo de electroforesis de 2:30 horas. El primer padre (Philip) y la hija exhiben dos bandas de aproximadamente 150 y 160 pb, siendo más evidentes en la hija. La madre comparte la banda de 160 pb y presenta otra banda de aproximadamente 170 pb. En el pedigrí del gringo, se observó con mayor detalle la presencia de dos bandas de alrededor de 150 pb y 130 pb que se muestran en la figura 4 (flecha delgada) los cuales corresponden a dos alelos de 130 y de 150 pb, presentes tanto en el padre como en la hija (carriles 5 y 7, respectivamente). La madre comparte el alelo de 150 pb y revela un alelo de mayor tamaño, probablemente de 160 pb. Por otro lado, la nieta con parentesco de hija-nieta (carril 8), sólo exhibe el alelo de 150 pb.

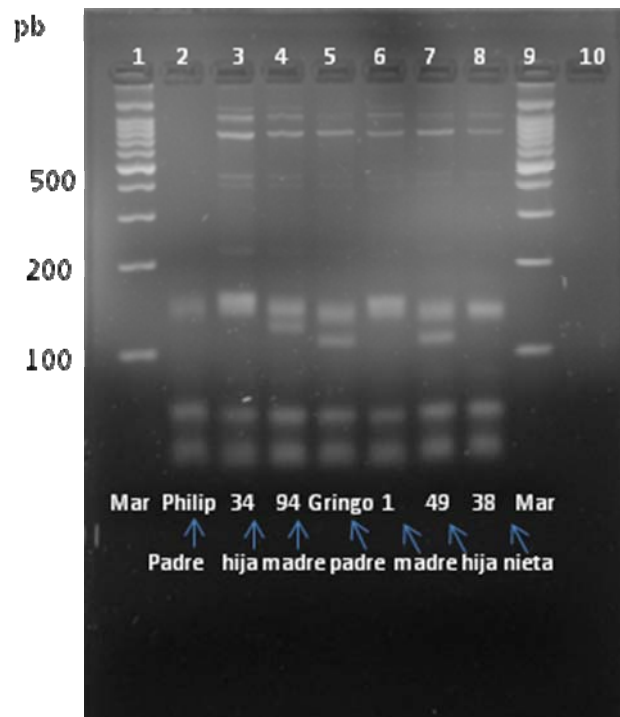


Figura 6. Amplificación de alelos de un producto de PCR con temperatura de 57° C (Gel de agarosa al 3%, 1.5 mM de 2 pedigrís con los marcadores IN11, utilizando temperaturas CIM_g). Electroforesis: 2:30 horas.

V. DISCUSIÓN

La elección de los marcadores IN11, SR- 1 y SR- 5 utilizados en el presente trabajo se realizó con base a los valores altos de PIC reportados (0.920, 0.866, 0.806, respectivamente) que indican alto polimorfismo, y por lo tanto presentan buenas características para el diagnóstico de paternidad (Arévalo., *et al* 1999; Pepín *et al.* 1995). La importancia de realizar la estandarización de la PCR en cada laboratorio radica en las diferencias derivadas del equipo utilizado.

El principal criterio a definir es la temperatura de alineación de los iniciadores misma que utiliza como referencia la T_m de cada iniciador (Pepín, *et al* 1995). Las temperaturas recomendadas por el proveedor (Integrated DNA Technologies, 2012) para SR-1 fue de 53.8°C para ambos iniciadores. Sin embargo, la diferencia en la T_m de los iniciadores de SR5 e IN11 fue mayor. Para SR-5, la temperatura del iniciador sentido fue de 56.6°C y el antisentido de 50.2°C mientras que para IN11 fue de 58.4°C y 53°C, respectivamente. Dado que la T_m de los iniciadores presentó un rango amplio de temperatura (50.2°C a 58.4°C), y la determinación de paternidad utiliza preferentemente varios marcadores para establecer un pedigrí, es conveniente obtener una temperatura de alineación que permita la amplificación de los tres marcadores. Por tal motivo, se seleccionó una temperatura que estuviese en el promedio del rango (54°C) y una más alta (56°C) para cubrir los requerimientos de IN11 el cual presentaba un promedio de temperatura más alto. Bajo estas condiciones, se aprecia que la temperatura de 54°C no favoreció la amplificación del marcador IN11 mientras que la amplificación de SR1 y SR5 fue exitosa utilizando ambas temperaturas (Figura 1). Dado que la T_m presenta una relación directamente proporcional al porcentaje de G-C (Ricaño *et al.*, 2007), los requisitos para la amplificación de IN11 eran más exigentes debido al alto porcentaje de G-C del iniciador sentido (73%). Lo anterior explica la ausencia de amplificación a 54°C. Por el contrario, el mayor balance de contenido de G-C de los iniciadores de SR1 y SR5, mismo que se encontraba dentro del estándar requerido de <50% (Ricaño *et al.*, 2007), permitió que la fluctuación de temperatura no afectara la amplificación. De hecho, la amplificación de SR1 y de SR5 ha sido realizada a 50 °C y 55°C, respectivamente (Arévalo *et al.*, 1999). El tamaño de los productos obtenidos para SR- 1 fueron aproximadamente de 150 pb y se encuentran dentro

del rango descrito (130 -150 pb) en la literatura de los alelos de SR1 (Arévalo *et al.*, 1999). Del mismo modo, los productos de la amplificación de SR5 (aproximadamente a 180 pb) se encuentran dentro del rango de tamaño esperado de 158 a 180 pb (Arévalo *et al.*, 1999). Con respecto a IN11, el producto sospechoso de mayor tamaño se encuentra por arriba de los tamaños descritos en la literatura (Pepín *et al.*, 1995) los cuales son de alrededor de 150 pb. Lo anterior sugería que se trataba de una amplificación inespecífica. Sin embargo, no se podía descartar puesto que existen secuencias de tamaño menor (112 pb) con base a la alineación de los iniciadores utilizados con base a las secuencias disponibles en el GenBank por lo que es posible existan alelos de mayor tamaño al descrito de acuerdo a los polimorfismos de una población dada. El otro producto (150 pb) se encontraba en rango por lo que ambos en un inicio fueron considerados como alelos sospechosos (Figura 1). Con la finalidad de reducir la presencia de amplificaciones inespecíficas en IN11, se realizó un gradiente de temperatura. Se observó que a pesar de eliminar dichas amplificaciones a para IN11 a 59°C y 60°C, la amplificación fue mayor a 57°C.

La concentración estándar de MgCl₂ en una PCR es de 1.5 mM (Pépin *et al.*, 1995). Dicha concentración también ha sido referida para los marcadores (INRA11). Por tal motivo, en el tamiz inicial y en el gradiente de temperatura para IN11, se utilizaron 1.5 mM de MgCl₂ en la mezcla de PCR. Sin embargo, en la literatura se han descrito concentraciones mayores de MgCl₂ para la amplificación de los marcadores utilizados en el presente trabajo (Jandurová *et al.*, 2004), llegando incluso a la concentración de 2.5 mM MgCl₂ para SR1 e IN11 (Jarurova *et al.* 2004). De este modo, para evaluar el efecto de la concentración MgCl₂ en la amplificación de los marcadores, se utilizaron de 2.0 mM de MgCl₂. Para dicho efecto, se utilizó una temperatura de 60°C la cual eliminó las amplificaciones inespecíficas de IN11 y amplificó productos de SR1 y SR5. Bajo dichas condiciones, se amplificaron nuevamente productos inespecíficos para IN11 y la amplificación de los tres marcadores fue reducida en comparación de los ensayos anteriores ya que las bandas obtenidas se observaron muy tenues. La falta de amplificación del producto sospechoso de 230 pb sugería que no era un alelo de IN11. Así mismo, se probó la amplificación en formato múltiple con los tres marcadores a pesar de que los tamaños esperados para SR1 e IN11 son similares. Aparentemente, sólo se amplificaron alelos de SR1 dada la similitud con las bandas del SR1 en formato único (Figura 3, corchete) pero sin secuenciación no se puede descartar a

IN11. Lo anterior imposibilita la utilización del formato de PCR múltiple con los iniciadores utilizados pero puede ser considerado si uno de los pares de iniciadores es modificado para la obtención de un producto de mayor tamaño. Dicha estrategia ha sido empleada por otros investigadores (Jandurova *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2006). Con base a los resultados obtenidos, se seleccionó la temperatura de alineación 57°C y la concentración de MgCl₂ de 1.5 mM para la amplificación de los tres marcadores debido a que esta temperatura mostró una mayor amplificación de IN11, a pesar de la alta posibilidad de que el producto de 230 pb de IN11 fuera inespecífico. La temperatura seleccionada también era compatible con la amplificación de los marcadores SR1 y SR5 ya que las temperaturas adicionales probadas amplificaron los mismos productos obtenidos en el tamiz inicial (Figura 2), y sólo era un grado por encima de las empleadas por (Arévalo, *et al.*, 1999).

Por otro lado, otro aspecto importante en la determinación de paternidad es la correcta visualización de los alelos presentes. Para dicho efecto, se debía determinar el tiempo óptimo de electroforesis y/o la concentración del gel de agarosa. Estos parámetros están estrechamente relacionados debido a que tienen una relación directamente proporcional. Como se mencionó anteriormente, con una concentración de agarosa de 1.5% se pudieron discriminar los productos a partir de un tiempo de electroforesis de 75 minutos y se mejoró la visualización a los 90 minutos. Sin embargo, dicha separación de productos no es suficiente para la recuperación de bandas a partir del gel de agarosa con fines de una posterior secuenciación. Dicha situación se solventó mediante el uso de una concentración de agarosa del 3% (Figura 6). La amplificación de alelos del marcador de IN11 resultó en la visualización adecuada con fines de recuperación de bandas puesto que se observaron productos claramente separados de aproximadamente 130pb y 150 pb, respectivamente. Estos productos se encuentran en los rangos descritos (Pépin *et al.*, 1995). De este modo, la discriminación de un par de alelos y su recuperación a partir del gel de agarosa permite su secuenciación y comparación entre individuos de un grupo familiar con fines de emitir un resultado de paternidad confiable e integrar un registro de parentesco del rebaño con fines de establecer programas de selección.

Con respecto a los probables alelos obtenidos consistentemente en los tres marcadores utilizados concuerdan con los hallazgos descritos (Bhebhe, *et al.*, 1994; Arévalo *et al.*,

1999; Pépin *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 2006) y la similitud del tamaño de las bandas son altamente sugestivos de paternidad (Figuras 4-6) puesto que los marcadores empleados son exclusivos de paternidad. La incorporación de la madre es recomendable para incrementar la exactitud de la prueba de paternidad (Mello *et al.*, 2010). En el presente trabajo, la amplificación del ADN de la madre para los tres marcadores revela la presencia de un producto del mismo tamaño que el amplificado en el padre y en la hija (Figura 4-6), y sugiere la presencia de un alelo dominante en la línea familiar y/o un posible parentesco entre el padre y madre. Lo anterior indica una alta probabilidad de consanguinidad en el rebaño. En la figura 6, la amplificación de un solo producto de IN11 en la nieta que comparte con los miembros de la línea familiar (de aproximadamente 150 pb) apoyan la noción de la presencia de un alelo dominante y es compatible con la existencia de un alelo nulo. Estos alelos se presentan en individuos homocigóticos o cuando existe una mutación. Debido a que las mutaciones son menos frecuentes la causa más probable es la homocigosis (Botstein *et al.*, 1980; Jiménez *et al.*, 2006). Lo anterior apoya fuertemente la noción de consanguinidad en el rebaño empleado. Sin embargo en nuestro estudio no se realizó la secuenciación y los tamaños de los productos amplificados no nos proporcionan las secuencias. Además, el no contar con las secuencias imposibilita la obtención de algunos índices (Índice de Contenido Polimórfico (PIC): Heterocigosidad (H) y sobre todo la Probabilidad de exclusión (PE), que corroboren la paternidad (Méndez *et al.*, 2000). Generalmente, la mayoría de los estudios (Salinas-toldo *et al.*, 1993; Bhebhe *et al.*, 1994; Ferreira y Monteagudo., 1999; Russel *et al.*, 2000; Ozkan *et al.*, 2009), coinciden en que se requieren por lo menos la utilización de 8 marcadores para determinar paternidad. Sin embargo, eso implica un costo considerable para las condiciones económicas de las explotaciones caprinas en nuestro país. Se propone el uso de los tres marcadores utilizados en el presente estudio puesto que se pudieron establecer relaciones de parentesco concordantes con la subsecuente secuenciación de los alelos amplificados.

VI CONCLUSIONES

En general se pudo determinar que en el presente trabajo, en la prueba de PCR la temperatura óptima para la determinación de la paternidad para los marcadores SR- CRSP-1, SR- CRSP- 5 e INRA011c ocurrió a los 57 °C, temperatura en la que ocurrió un mejor desempeño, además que en los tres marcadores esta temperatura aporta las condiciones necesarias para su funcionamiento óptimo.

En relación a la concentración de MgCl₂, un mejor comportamiento de la prueba ocurrió a la concentración de 1.5 μM, debido a que en esta concentración las bandas se observaron con una mejor intensidad.

En cuanto a la concentración de Agar se puede concluir que la concentración de 3% ofreció las mejores condiciones para la observación de bandas ya que permitió una mejor separación de estas y fue posible eliminar las confusiones por la existencia de otras bandas.

Por otro lado los marcadores SR-CRSP-1, SR-CRSP-5 y INRA011c para el tamaño del rebaño que se trabajo y con el uso de 2 sementales es posible detectar la paternidad.

VII LITERATURA CITADA

- 1) Acosta, J., Martínez, A., Pestano, J., Cabello, A., Brown, P., Sarah, S., Delgado, J., 2005. Caracterización Genética de la cabra Majorera de Fuerteventura con microsatélites. *Arch. Zootec.* 54: 261-266
- 2) Albert, B., Bray, D., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. 1994. *Molecular Biology of the Cell.* New York. Garland Publishing. 519
- 3) Arévalo, E., Holder, D., Der, J., Bhebhe, E., Linn, R., Ruvuna, F., Davis, S., Taylors, J. 1999. Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP1, SR-CRSP2, SR-CRSP3, SR-CRSP4, SR-CRSP5, loci. *Animal Genetics.* 25(3):202
- 4) Avila, C., de Vera, A., Hernández, C., Martín, P. 1995. Análisis del ADN II; Clonar secuenciar y PCR. *Nefrología* vol. XV suplemento 2
- 5) Barrera, S., Ascacio, M., Sifuentes, R., Arellano, V., Arbiza, S. 2010. Applications of biotechnology and genomics in goats. *Small Ruminant Research* 30-30
- 6) Boloimaa, S., Ruuinsky, A., Walkden, S. 2008. DNA based parentage verification in two Australian goat herds. *Small Ruminant Research* 80, 95-10.
- 7) Bhebhe, E., Kogi, J., Holder, D., Arevalo, E., Derr, J., Ruvura, F., Davis, S., Taylor, J. 1994. Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP6, SR-CRSP7, SR-CRSP8, SR-CRSP9 and SR-CRSP10, loci. *Anim. Genet.* 25-203.
- 8) Botstein, D., Raymond, L., Skolnick, M., Ronald, W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331
- 9) Cstahlberg, R., Harlizius, B. 2000. Identification of embryo paternity using polymorphic ADN markers assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. *Theriogenology* 53(6):1365-1373
- 10) Darío, R., Nestor, E., Genero, E., Broccoli, A., 2006. Avances en la caracterización genética y morfológica del Bovino criollo de origen Patagónico. *Archivos de zootecnia* 325-344.

- 11) De-Sousa, B., Martínez, A., Ginja, C., Santos, F., Carolino, M., Delgado, J., Gama, L. 2011. Genetic Diversity and population structure in Portuguese goat breeds. *Livestock Science*. 135:131-139
- 12) Ferreira, E., Monteagudo, V. 1999. Populations genetics and paternity in breed Aragonesa sheep using DNA finger printing. *Rev Vet Sci*. 67(1): 2326
- 13) Garzón, G; Zarazaga, B; Vallejo, V; Rodero, F; 1976. Polimorfismo bioquímico de la raza caprina granadina. *Arch. Zootec*. Vol. 25. N. 98. P.147.
- 14) Jandurova, M., Kott, T., Kottová, B., Czerneková, V. 2004. Seven microsatellite marker useful for determining genetic variability in white and Brown Short-haired goat breeds. *Small Ruminant Research*. 52:271-274
- 15) Jandurova, M., Kott, T., Kottová, B., Czerneková, V., Milerski, M. 2006. Genetic relationships among Sumava, Valachian and Improved Valachian sheep. *Small Ruminant Research*. 65:266-273
- 16) Jiménez C.O. 2012. Evaluación de la funcionalidad de un bolo intraruminal de identificación permanente en ovinos Tesis FES-Cuautitlán UNAM.
- 17) Jiménez-Gallardo., Dorado, G., Muñoz., A., Analla, M., Moraga, A. 2006. DNA microsatellites to ascertain pedigree- recorded information in a selecting nucleus of Murciano- Granadina dairy goats. *Small Ruminant Research* 65:266-277
- 18) Johan, A., Van Arendonk. 2011. The role of reproductive technologies in breeding schemes for livestock populations in developing countries. *Livestock Science* 136:29-37
- 19) Kokinen, M.T. 2001. Microsatellite based population structures within and between kive finnish dog breeds. 4-IV-03
- 20) Leboeuf, B., Manfredi, E., Boue, P., Terquia, M. 1998. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Production Science*. 55: 193- 203
- 21) Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. 1990. Use of Uracil ADN glycosilase to control carryover contamination in PCR. *Gene* ;93:125-8 .
- 22) Luikart, G., Biju, D., Ertugrul, O., Zagdsuren, Y., Maudt, C., Taberlet, P. 1999. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplex for parentage testing in goats. *Animal Genetics*. 30: 431-438
- 23) Maddox J., Cockett, N. 2007. On sheep and goat linkage maps and other genomic resources. *Small Ruminant Research*. 70:24-20.

- 24) Martínez, A., Correa, M., Acosta, J., Rodríguez, G., Cabello, A., Camacho, E., Delgado, J. 2004. Análisis molecular de la cabra blanca Andaluza. Arch. Zootec. 53: 221-224.
- 25) Madueño, R. y Morera, Z. 1987. Obtención de sueros reactivos y caracterización de la raza Malagueña. Arch. Zootec. Vol.36 (135): 187.
- 26) Mellado, M., Cárdenas, C., Ruíz, F. 2000. Mating behavior of bucks and does in goat operations under range conditions Applied Animal. Behaviour Science. 67:89-96.
- 27) Mello, A., Facioni, S., Pereira, C., Savio, P., Teixeira, M., Medeiros, T. 2010. Paternity in Brazilian goats through the use of DNA microsatellites. Revista Brasileira de Zootecnia. 39:1011-1014.
- 28) Méndez S. y Pérez E. 2000. La PCR múltiple en microbiología clínica. Capítulo 10. Pág. 72-80
- 29) Murray. K., Granner, K., Mayer, A., Rodwell, W. 2001. Bioquímico de Harper México. Manual Moderno. 461-480.
- 30) Nechtelberger, C., Kaltwasser, I., Stur, J., Mayer, G., Bren, M., Muller, S. 2001. Sequence analysis of goat major histocompatibility complex class I genes. Animal Biotechnology. 12(2):141-114.
- 31) Oskan, E, Thasan, S., Ozder, K., Koban, E., Sahin, O., Togan, I. 2009. Evaluation of parentage testing in the Turkish Holstein population based on microsatellite loci. Livestock Science. 124:101-106.
- 32) Pépin, L., Amigues, Y., Lépingle, A., Berthier, J., Bensaid, A., Vaiman, D. 1995. Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples analysis. Heredity 74-53-61.
- 33) Pitel, F. y Riquet, J. 2000. Les marqueurs anonymes et la détection de leur polymorphisme. Génétique Moléculaire 45-53
- 34) Ricaño, I., Antaramian, A., González, G., Ahumada, M. 2007. Curso RT-PCR y PCR en tiempo real. Unidad de proteogenómica Instituto de Neurobiología UNAM, Campus Juriquilla.
- 35) Rubén, C., Eduardo, N., Enrique, G., Ana, B. 2006. Avances en la caracterización Genética y Morfológica del Bovino criollo de origen Patagónico. Arch. Zootec. 41; 325- 344.

- 36) Russel, L., Rios, J. Eros, G. 2000. Genetic differentiation among geographically isolated populations of criollo and their divergence from other Bos Taurus breeds. *Journal of Animal Science*. 78:2314-2322.
- 37) Salinas- toldo, S., Fries, R., Steffen, R., Neibergs, G. 1993. Physically mapped, cosmid- derived microsatellite markers as anchor loci. *Small Ruminant Research*. 72:2537-2462.
- 38) Sevane, N.,Cañón J.,Dunner S., C. 2010. A primer- Extension Assay for simultaneous use in cattle genotype assisted selection, parentage and traceability analysis. *Livestock Science*. 30:30-30
- 39) Schibler, L., Vaiman, D., Cribu, E. 2000. Origine du polymorphisme de I AND. *Génétique Moléculaire* 37-43.
- 40) Vaiman, D., Laurent, S., Florence, B., Anne, O., Yues, A., Edmond, C. 1996. A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics Society of America* 280-297
- 41) Visser, C.,Crooijmans, R., Marle, K. 2010. A genetic linkage map for the South African Angora goat. *Small Ruminant Research*. 93:171-179.
- 42) Zajc, L., Simpson, J. 1996. DNA microsatellites in domesticated dogs application in paternity disputes. *Small Ruminant Research*. 431(6): 201-202.
- 43) Zhao, S., Yang, L. 2001. Analysis of genetic variation among five chinese indigenous goat breeds by the next acurrance of using bovine and ovine microsatellite. *Cosul* 4-IV-03

www.bio.net/bionet/.../genbankb/2013.../000365.ht