

114



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**IDENTIFICACION DE VARIANTES GENETICAS DEL  
*locus Nramp1* EN BOVINOS DE DISTINTOS  
LINAJES.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**  
P R E S E N T A  
**FELICITAS VAZQUEZ FLORES**

ASESORES: M. EN C. CIRO ESTRADA CHAVEZ  
DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

# PAGINACION DISCONTINUA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: FELICITAS JAZQUEZ FLORES

FECHA: OCTUBRE 08 DE 2002

FIRMA: *F. Jazquez Flores*

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





ESTADO NACIONAL  
AGRICOLA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. I. A. M.  
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Identificación de Variantes Genéticas del locus Nramp1  
en Bovinos de distintos linajes"

que presenta la pasante: Felicitas Vázquez Flores  
con número de cuenta: 8807420-5 para obtener el título de :  
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de julio de 2002

PRESIDENTE Dr. Miguel Angel Carmona Medero

VOCAL Dr. Benito López Baños

SECRETARIO Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales

PRIMER SUPLENTE MVZ. Esperanza García López

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Maura Cruz Fierro

"Sólo el insensato puede creer que para pintar basta con adquirir la habilidad de la mano y utilizar el pincel de seda más fino, el lápiz del más bello color negro o el papel de la mejor calidad. Únicamente podrá ser pintor verdadero aquel que halla sabido meditar durante años, identificándose con el objeto de su estudio y convertirse en árbol, torrente, hierba, lluvia o pájaro... cuando mi corazón hace eco al universo, cuando ha conseguido el acuerdo pleno entre mi espíritu y mi mano, entonces es cuando empiezo a pintar y sobre la seda, que mi pincel acaricia, están en armonía el cielo, la Tierra y el hombre en libertad...."

Kuo Hsi

"La ciencia no consiste sólo en saber lo que debe o puede hacerse, sino también en lo que podría hacerse... aunque quizá no debiera hacerse... El sabio debe velar de alguna manera los secretos que descubre para evitar que otros hagan mal uso de ellos..."

Guillermo de Baskerville

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Ciro Estrada Chávez, por su confianza, apoyo, paciencia y amistad. Por todo el tiempo invertido en mí y en el presente trabajo, buscando siempre la calidad en el mismo.*

*Al Dr. Rogelio Alonso Morales, por su apoyo y disponibilidad, pero principalmente por la confianza puesta en mí.*

*A la Dra. Camila Arriaga Díaz, por todas las facilidades otorgadas para el desarrollo de buena parte del trabajo en el laboratorio de Biotecnología en el CENID-Microbiología.*

*A la MVZ Ekvira Carrera Salas y a la M. en C. Guadalupe Socci Escalante, por sus asesorías, por su tiempo y amistad que siempre me han brindado en la forma más sencilla, desinteresada e incondicional.*

*A la Dra. Refugio Cortés Fernández, por su valiosa ayuda, orientación y amistad, dentro y fuera del trabajo y las labores académicas; especialmente por tomarse la molestia y el tiempo para la revisión de este trabajo.*

*Al Dr. Raúl Ulloa Arvizu, por sus asesorías y por su gran amistad.*

*En forma muy especial al MVZ Rafael Pérez González, al M. en C. Víctor Banda Ruiz y al Dr. Fernando Díaz Otero, por todas sus orientaciones, porque cada uno de ellos me ha permitido tener acceso a sus valiosos conocimientos y a su amistad.*

*Al H. Jurado, por tomarse la molestia y el tiempo para la revisión y corrección de este trabajo: Dr. Miguel A. Carmona Medero, Dr. Benito López Baños, Dr. Rogelio A. Alonso Morales, M. en C. Esperanza García López y MVZ Maura Cruz Fierro. Gracias por sus aportaciones.*

*A la FES-Cuautitlán, con todo mi cariño, por contar con la carrera más bella y noble del mundo: Medicina Veterinaria y Zootecnia y por permitirme haber estudiado en sus instalaciones. Porque a pesar de los pocos recursos con que cuenta, siempre hay quienes se interesan por una preparación de calidad.*

*A "Marte", mi mamá, desde aquí y hasta "Mictlán", por creer siempre en mí... A mi papá, Antonio Vázquez Velázquez por su invaluable ayuda durante el desarrollo de todos mis estudios.*

*A Cris: Mi Hermana, Amiga, Consejera y mi más grande apoyo. Espero corresponder en parte de todo lo que me has dado...*

*Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero para la realización del trabajo de tesis en el Proyecto QEF.: 28637-B.*

## DEDICATORIAS

*Dedico este trabajo...*

*A mis muchos hermanos y hermanas: Toño, Cris, Tere, Gerardo, Lola, Silver, Lupe, Germán, Memo y Toña.*

*A Donovan y Vic, que han traído grandes momentos y alegría a mi vida. A Naza*

*A mis mis más grandes amigos y compañeros de aventuras en esta fantástica historia llamada "VIDA":*

*Telma porque siempre está conmigo; Miguelito, Gera, Silvia, Roe, Irma, Luis, Ame, Francis, Sandy, Uriel, Octavio, Mar, Alex ("Caniche"), Vero Gómez, al "inge": Rodrigo Marcos, Lupita Quevedo, a Estela Camarillo (donde quiera que te encuentres). A Juana Raya (un gran ejemplo a seguir).*

*A todos mis compañeros y amigos en el laboratorio: M. en C. Aurora Romero, M en C. Margarita Robledo, MVZ Cecilia, QBP Patricia, M. en C. Noemi Viveros, Biol. Maribel Hernández, Biol. Omar Zavala; a Marthita, Sra. Jose, Sr. Rodolfo; a la Biol. Amanda, Gayosso, M. en C. Silvia Reyes, Dr. J. Antonio Figueroa, M. en C. Belém Huerta, Dr. Simón Martínez, Biol. Noé Reyes, MVZ Espiridión Ramos, Dra. Rebeca Acosta, M. en C. Esperanza García,, MVZ Mario E. Espinoza, M. en C. Carmen Castro, Biol. Jesús, M en C. Iván Leyva, MVZ Luz Ma. Granados, Quím. Alejandro, MVZ Addi M. Oropeza, MVZ Cristina López, MVZ David Reynoso, Biol. Verónica Ocampo, MVZ Dalila D'asencao, y MVZ Simone I.*

*A la Dra. Ana Laura Pereyra*

*A Teddy, Cleo, Rina, Boogie, Coco y Doddi Laffayette, por haber sido tan buenos compañeros. A Nicha Mandý y Boni por su fiel amistad.*

*A quienes les debo todo el conocimiento que he adquirido: los Animales, con mi más grande reconocimiento, agradecimiento y con todo mi cariño.*

*A quienes consideren que les halla fallado y a pesar de todo, continúan creyendo en mí.*

*A tí que ocupas parte de tu tiempo leyendo este capítulo por "curiosidad" o alguno de los otros quizás por error...*

*A los grupos de "Rock" por hacer el "Sound track" de este trabajo y en general, de mis mejores ratos...*

*.....a los que me faltan...*

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIAS .....	II
CONTENIDO .....	III
INDICE DE CUADROS .....	V
INDICE DE FIGURAS .....	VI
RESUMEN .....	VII
INTRODUCCIÓN .....	1
I. REVISION DE LITERATURA .....	2
1.1 Perspectiva histórica .....	3
1.2 Marcadores moleculares .....	4
1.3 Microsatélites .....	5
1.4 Polimorfismo genético .....	6
1.5 El gen <i>Nramp1</i> .....	7
1.6 <i>Nramp1</i> bovino .....	9
II. JUSTIFICACION .....	11
III. OBJETIVOS E HIPOTESIS .....	12
3.1 Objetivo general .....	12
3.1.1 Objetivos particulares .....	12
3.2 Hipótesis .....	12
IV. MATERIAL Y METODOS .....	13
4.1 Animales .....	13
4.2 Purificación de ADN .....	13
4.2.1 Cuantificación .....	14
4.2.2 Electroforesis .....	15
4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	15
4.3.1 Diseño de oligonucleótidos .....	16

4.3.2 Electroforesis de productos de PCR .....	17
4.4 Preparación de productos de PCR para su análisis.....	18
4.4.1 Identificación y tamaño de alelos .....	18
V. RESULTADOS .....	19
5.1 Frecuencia alélica en la población de estudio .....	22
5.2 Heterocigocidad de la población .....	24
5.3 Frecuencia y heterocigocidad de alelos para locus Aro28.	26
5.4 Frecuencia y heterocigocidad para locus 311-322.....	29
5.5 Frecuencia y heterocigocidad de genotipos identificados..	33
5.6 Haplotipos identificados.....	35
VI. DISCUSION .....	37
VII. CONCLUSIONES .....	43
7.1 Perspectivas .....	44
REFERENCIAS .....	45
APENDICES	
1. Purificación de ADN a partir de muestras de semen .....	47
2. Purificación de ADN a partir de muestras de sangre .....	48
3. Abreviaturas .....	49
4. Glosario .....	50
5. Percentiles de la distribución ji-cuadrada .....	54

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.-</b> Población de estudio .....	14
<b>Cuadro 2.-</b> Oligonucleótidos .....	17
<b>Cuadro 3.-</b> Frecuencias alélicas y heterocigocidad en la población .....	24
<b>Cuadro 4.-</b> Resultados del análisis estadístico de frecuencias alélicas .....	25
<b>Cuadro 5.-</b> Frecuencias genotípicas .....	34
<b>Cuadro 6.-</b> Haplotipos identificados en la población .....	36

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- Estructura y función de la proteína NRAMP1.....	8
Fig. 2.- Localización de los microsatélites evaluados en el gen <i>Nramp1</i> .....	9
Fig. 3.- Electroforesis de ADN genómico homogenizado a 50 ng/ $\mu$ l.....	20
Fig. 4.- Amplificación por PCR del microsatélite <i>Aro28</i> con diferentes concentraciones de magnesio .....	21
Fig. 5.- Amplificación por PCR del microsatélite 311-322 con diferentes concentraciones de magnesio .....	21
Fig. 6.- Electroforesis del microsatélite <i>Aro28</i> amplificado por PCR .....	22
Fig. 7.- Electroferograma del análisis de microsatélites por Genescan .....	23
Fig. 8.- Alelos <i>Aro28</i> .....	26
Fig. 9.- Alelos <i>Aro28</i> Europeos.....	27
Fig. 10.- Alelos <i>Aro28</i> Asiáticos.....	28
Fig. 11.- Alelos <i>Aro28</i> Criollos.....	28
Fig. 12.- Alelos <i>Aro28</i> Cruzas.....	29
Fig. 13.- Alelos 311-322.....	30
Fig. 14.- Alelos 311-322 Europeos.....	30
Fig. 15.- Alelos 311-322 Asiáticos.....	31
Fig. 16.- Alelos 311-322 Criollos.....	32
Fig. 17.- Alelos 311-322 Cruzas.....	32
Fig. 18.- Alelos <i>Nramp1</i> en bovinos.....	39

## RESUMEN

**Identificación de variantes genéticas del locus *Nramp1* en bovinos de distintos linajes.** Felicitas Vázquez Flores. Asesores: M en C. Ciro Estrada Chávez y Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

El objetivo principal del presente trabajo, fue identificar variantes alélicas para el gen *Nramp1* en una población compuesta por 95 bovinos de distintos linajes (europeos, asiáticos, criollos y productos de cruzas) donde se incluyeron hembras y machos, mediante la amplificación y análisis de 2 microsatélites localizados en éste gen, y que fueron denominados *Aro28* y *311-322*. Para llevar a cabo el experimento se utilizó ADN obtenido a partir de muestras de semen o sangre periférica de los animales de estudio. La amplificación de los dos microsatélites se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los productos amplificados fueron sometidos a análisis en un secuenciador automático para obtener el tamaño de los alelos. Previamente habían sido reportados 8 alelos con tamaños desde 256 hasta 270pb para el locus *Aro28* y uno de 223pb para el *311-322*. En el presente trabajo fueron encontrados 17 alelos para ambos loci: 12 para el primero y 5 para el segundo (4 alelos nuevos para cada locus). De manera, que los resultados del presente trabajo, aportan otras variantes alélicas que permitirán ser utilizadas en futuros estudios de asociación del locus *Nramp1* con la resistencia natural a enfermedades causadas por patógenos intracelulares en bovinos.

**Palabras clave:** locus *Nramp1*, microsatélites, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), Bovinos.

## INTRODUCCION

Los microsatélites son un tipo de marcadores genéticos que consisten en secuencias de bases repetidas y permiten ser amplificados de una manera específica, una vez que han sido localizados en el gen de estudio; asimismo, los microsatélites permiten establecer su relación con un rasgo importante, como es el caso de la resistencia natural a enfermedades. En países en vías de desarrollo, las pérdidas atribuibles a enfermedades infecciosas en el ganado, siguen constituyendo todavía un gran problema para la industria agropecuaria aun a pesar de las medidas de control sanitario.

El incremento a la resistencia a enfermedades mediante selección asistida por marcadores moleculares, en combinación con medidas de control sanitario, sería de gran ayuda para la solución a este problema. Un gen candidato para la resistencia a infecciones causadas por patógenos intracelulares es el *Nramp1*, que codifica para la proteína de macrófagos asociada a resistencia natural; y toma su nombre debido a que se expresa preferentemente en esas células de defensa. En un futuro, la genética comparada y la evaluación de genes candidatos apoyada en el uso de marcadores genéticos, permitirán conocer progresivamente los mecanismos genéticos de la resistencia a enfermedades para un mejor desarrollo y mantenimiento de una ganadería competitiva, adecuándola de esta manera, a las condiciones propias del País. De manera que el presente estudio tuvo como propósito identificar variantes genéticas del *locus Nramp1* en diferentes linajes de bovinos mediante el análisis de microsatélites usados como marcadores moleculares, con el objetivo de proporcionar una herramienta útil en futuros estudios de asociación a resistencia natural a enfermedades causadas por patógenos intracelulares en el ganado bovino.

## I. REVISION DE LITERATURA

En los últimos 50 años, los conceptos y aplicaciones de la genética molecular han ido evolucionando aceleradamente. Se ha desarrollado un gran número de métodos y técnicas que permiten el análisis detallado del genoma y de los genes útiles en la evaluación de los caracteres hereditarios y en la identificación animal. En el ganado, la identificación de nuevos marcadores de ADN asociados con características productivas, contribuirá a mejorar la eficiencia y la intensidad de la selección para el rendimiento y calidad de la leche o carne (Ramel, 1997; Uffo *et al.* 2000).

La importancia en la investigación de genomas en el campo veterinario radica en su contribución al desarrollo y mantenimiento de una ganadería competitiva mediante la preservación, estudio y explotación de recursos genéticos, identificación, clonación y estudio de genes de importancia médica y comercial y la transferencia de tecnología a la industria animal local, adecuando de esta forma la ganadería a las condiciones propias del País (Alonso y Ulloa, 1997; Uffo *et al.* 2000).

En países no desarrollados, las pérdidas atribuibles a enfermedades infecciosas siguen constituyendo un problema para la industria agropecuaria, aun a pesar de las medidas tradicionales de control sanitario. Una solución a dichas pérdidas podría encontrarse en el aumento de los niveles de resistencia genética a enfermedades, ligada a mecanismos tanto inmunológicos como no inmunológicos. Se ha podido observar que esa resistencia genética es hereditaria y pudiera ser una posible alternativa para mejorar la sanidad de los sistemas zosanitarios mediante la aplicación de programas de selección que permitan aumentar el nivel general de resistencia a diversas enfermedades. Aunque en la regulación de la resistencia genética a las infecciones bacterianas suelen intervenir numerosos genes que controlan distintos

procesos de la interacción huésped-patógeno, la identificación y caracterización de genes candidatos, el uso de marcadores genéticos y la genética comparada permitirían conocer progresivamente los mecanismos genéticos de dicha resistencia (Adams y Templeton, 1998; Soller y Andersson, 1998).

### **1.1. Perspectiva histórica**

La genética de Mendel es monofactorial, ya que estudia las características determinadas por un solo gen, sobre las cuales el ambiente ejerce poca influencia. Debido a lo anterior según Mendel, el fenotipo permite generalmente definir el genotipo sin margen a dudas o errores, lo que facilita la manipulación de éstas características de acuerdo a los objetivos deseados. Por el contrario, la mayoría de las características biológicas importantes desde el punto de vista productivo y económico, como los ritmos de ganancia de peso, eficiencia de conversión alimenticia, adaptabilidad, rusticidad y parámetros reproductivos o resistencia a enfermedades, son características multifactoriales; es decir, están determinadas por varios genes, y a su vez altamente influenciadas por factores ambientales y de manejo. Al estudiar las características multifactoriales, muchas veces el fenotipo poco dice del genotipo, sobre el cual se tiene que actuar para efectuar la selección (Uffo *et al.* 2000).

Las características biológicas con base genética multifactorial o poligénica (cuantitativa) fueron estudiadas por primera vez, desde el punto de vista genético, por Galton (Rocha y Barata, 1997). Los análisis estadísticos utilizados fueron correlaciones y covarianzas, pues con el estudio de las características cuantitativas no es posible detectar la segregación de genes individuales y observar las proporciones mendelianas clásicas. Este hecho originó un conflicto que marcó la fase inicial de la Genética, ya que por un lado los discípulos de Galton, se revelaban incapaces de ver mucho significado en las observaciones de Mendel y por el otro, los genetistas mendelianos, se

rehusaban a ver cualquier valor en los métodos estadísticos de Galton, lo que provocó un conflicto por la incapacidad de comprender cómo la base genética de las características cuantitativas podían encuadrarse en el modelo mendeliano (Rocha y Barata, 1997; Uffo *et al.* 2000).

Varios trabajos realizados por ambos grupos, establecieron que la variación genética de naturaleza cuantitativa, resulta de la acción combinada de varias entidades discretas (GENES), estos trabajos resolvieron el conflicto mostrando que el modelo mendeliano era general para todas las características con base hereditaria, pero que para las características cuantitativas, los métodos estadísticos de Galton, eran los únicos elementos analíticos disponibles, pues la detección de genes individuales no era posible, por lo menos de forma inmediata (Rocha y Barata, 1997).

## **1.2. Marcadores moleculares**

Las técnicas moleculares que permiten la detección de la variabilidad genética, relacionadas directamente con la molécula de ADN, se basan en diferentes tipos de marcadores moleculares. Dichos marcadores se utilizan en la construcción de mapas genómicos de las diferentes especies animales; esto se hace con el propósito de detectar y manipular los efectos de rasgos de naturaleza cuantitativa (*loci* de rasgos cuantitativos o QTLs) en programas de mejoramiento animal. Los mapas genómicos de los animales domésticos tienen como propósito incrementar su eficiencia y rentabilidad mediante el desarrollo del conocimiento necesario para la manipulación genómica. Estos mapas consisten en la generación de cientos de marcadores genéticos polimórficos, principalmente moleculares y la localización de sus posiciones a lo largo de los diferentes cromosomas. Lo deseable en estos mapas, es que posean la suficiente resolución para poder localizar, definir y utilizar *loci* que afectan las características comercialmente importantes y que tengan una aplicación

inmediata para mejorar la salud animal y su productividad, así como también para el desarrollo de nuevos productos pecuarios (Alonso y Ulloa, 1997).

El desarrollo de numerosas técnicas de análisis molecular en el ámbito de la ingeniería genética, entre ellas la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), han conducido a la introducción de nuevos marcadores genéticos, tales como los microsatélites, los STS (sitios marcados de secuencia) y los SNP (polimorfismos de nucleótidos simples); los que han permitido detectar diversos polimorfismos dentro de la molécula de ADN (NHGRI, 2001). Lo deseable en la introducción de esta nueva herramienta, es la construcción de mapas saturados de marcadores, regularmente ubicados a lo largo de todos los cromosomas y cubriendo todo el genoma, de forma que los efectos génicos individuales que afectan las características cuantitativas puedan ser detectados, marcados y posteriormente manipulados de forma más simple, objetiva y eficiente. Entre estos nuevos marcadores, los microsatélites son extremadamente numerosos y permiten abarcar todo el genoma de cualquier especie animal (Ramel, 1997; Alonso y Ulloa, 1997).

### 1.3. Microsatélites

Los microsatélites son secuencias repetidas de ADN distribuidas de manera uniforme en el genoma, particularmente se presentan en organismos multicelulares y se localizan principalmente en regiones intergénicas que no codifican (intrones). Estas secuencias repetidas se componen de 2 a 6 nucleótidos y son altamente polimórficas debido a su alta tasa de mutación que varía alrededor de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  eventos por *locus* por generación. Una de las ventajas de estos marcadores genéticos es la posibilidad de amplificarlos mediante PCR de forma específica, y al ser localizados, permiten establecer su relación con un rasgo importante, particularmente en caso de características cuantitativas (Ramel, 1997). Debido a sus características, actualmente los

marcadores genéticos del tipo microsatélite son considerados los más importantes para conformar mapas genéticos altamente saturados de cada uno de los cromosomas en muchas especies.

Con el uso de los microsatélites muchos QTLs han sido mapeados en regiones definidas del genoma, y en un futuro, distintos genes podrían ser identificados usando clonación posicional o mediante la comparación de secuencias de mapas genéticos de distintas especies como el ratón y el humano. Una de las características más importantes en el campo de la veterinaria es la resistencia a las enfermedades, ya que su conocimiento permitiría llevar a cabo una selección de aquéllos animales que presentan altos niveles de resistencia a enfermedades de difícil control (Ramel, 1997).

#### **1.4. Polimorfismo genético**

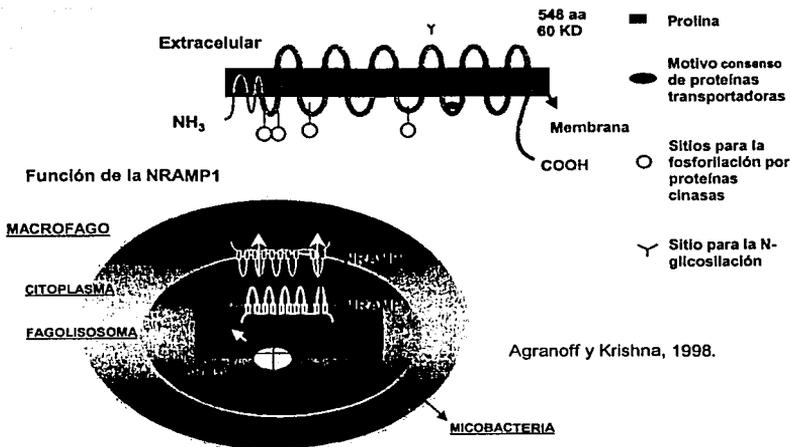
El polimorfismo genético o variación de origen genético, ha sido muy estudiado en poblaciones naturales, debido a que permite el análisis de fenómenos como variabilidad genética y frecuencia de mutaciones en caracteres relativamente fáciles de medir con base genética conocida y que presentan poca influencia del ambiente en su expresión fenotípica. Un polimorfismo se presenta al ocurrir variaciones discontinuas en la incorporación de bases al gen con lo que se producen secuencias diferentes en el genoma del individuo.

La variación de la naturaleza cualitativa de origen genético, dentro de las poblaciones se presenta en dos formas básicas: mutantes raros y polimorfismo genético. Atendiendo al factor de frecuencias, si la variante más escasa tiene menos de 1% se denomina mutante raro y si posee una frecuencia mayor de 1% estamos en presencia de un polimorfismo genético (Lewin, 2000; Mitchison, 2000).

## 1.5. El gen *Nramp1*

En 1980, con la idea de establecer las bases del control genético en la tuberculosis, se hicieron análisis de segregación mendeliana en distintas cepas de ratones con antecedentes de responder en forma distinta al reto con *M. bovis*/BCG después de ser inmunizados. De estos estudios, se sugirió la existencia de un gen autosómico dominante en ratones, cuyos efectos conferían a ciertas cepas la capacidad de controlar la infección por dicha micobacteria. Esta capacidad se hacía evidente en el periodo preinmune (Gros *et al.* 1981). Poco después se localizó un *locus* en el cromosoma 1 del ratón, al cual se denominó como *Bcg*. Desde ese entonces se sugirió que este gen tenía efectos pleiotrópicos que podían incrementar por diversas vías, la resistencia a tres distintos patógenos intracelulares: *Leshmania donovani*, *Salmonella typhimurium* y *Mycobacterium bovis*/BCG. Además, se encontró evidencia de dos formas alélicas de dicho gen: resistente *Bcg<sup>r</sup>* y susceptible *Bcg<sup>s</sup>* (Skamene *et al.* 1982; Blackwell *et al.* 1994).

En estudios posteriores se logró aislar un candidato al gen *Bcg*, denominado desde ese momento como gen que codifica para la proteína de macrófagos asociada a resistencia natural (*Nramp1*, por sus siglas en inglés), debido a que se expresa preferentemente en esas células. Al secuenciar al gen candidato, se estableció homología con genes que codifican para proteínas con una función transportadora de nitritos y nitratos (Vidal *et al.* 1993). En otros estudios, también se encontró homología de este gen con otro en levaduras que regula la entrada de magnesio a la célula y se ha propuesto que la proteína NRAMP1 (Fig. 1), puede funcionar como un regulador intrafagosomal de magnesio (Supek *et al.* 1996), hierro (Gruenheid *et al.* 1995), manganeso (Jabado *et al.* 2000) u otros cationes divalentes que son esenciales para el crecimiento y desarrollo del patógeno en el interior de la célula (Agranoff y Krishna, 1998; Mathieu, 2001).



**Figura 1.- Estructura y función propuestas para la proteína NRAMP1  
Regulador intrafagosomal de cationes divalentes.**

Inicialmente se describió que la estructura del gen *Nramp1* constaba de 1452 nucleótidos, los cuales contenían un marco de lectura abierto que codificaba para 484 aminoácidos y formaban una proteína con peso molecular de 53 KDa aproximadamente. Sin embargo, estudios posteriores permitieron identificar en la secuencia del extremo 5', un marco de lectura que codifica para 64 aminoácidos (Barton *et al.* 1994). en el extremo amino terminal de la proteína (Fig. 2).

Al comparar las secuencias de los genes aislados de cepas de ratones resistentes *Bcg<sup>r</sup>* y susceptibles *Bcg<sup>s</sup>*, en estos últimos se encontró una mutación puntual que provocaba un cambio de una glicina por un aspartato. Con los estudios de mapeo de los haplotipos en cepas *Bcg<sup>r</sup>* y *Bcg<sup>s</sup>* se estableció que: a) la glicina 169 es la forma silvestre de la NRAMP1; b) la

sustitución de este residuo por un aspartato determina el fenotipo *Bcg<sup>s</sup>* y c) los alelos de las cepas *Bcg<sup>s</sup>* tienen la misma mutación y son segregados con patrón mendeliano (Malo *et al.* 1994).

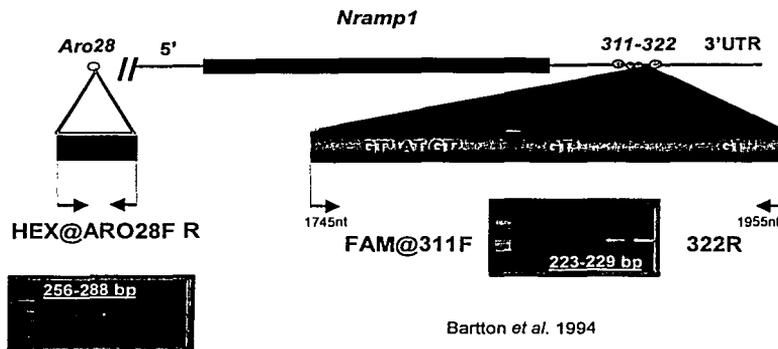


Figura 2.- Localización de los microsatélites evaluados en el gen *Nramp1*

### 1.6. *Nramp1* bovino

Por otra parte se clonó el gen homólogo en el ser humano y se encontró una homología del 89% con la secuencia del *Nramp1* del ratón (Vidal *et al.* 1993). En bovinos se aisló un gen con una homología de más del 85% al *Nramp1* de humano y del ratón. Estos genes se localizan en el *Bos taurus* autosoma 2 (BTA2), en el *Homo sapiens* autosoma 2q35 (HSA2q35) y en el *Mus musculus* autosoma 1 (MMU1). Debido a que conserva su localización cromosómica, homología en cuanto a secuencia aminoacídica, estructura protéica y la expresión predominante en macrófagos de bazo y pulmón se denominó a éste gen en bovinos como *Nramp1* bovino (Doisk *et al.* 1994; Feng *et al.* 1996; Gruenheid *et al.* 1995). En base a la secuencia nucleotídica obtenida y al

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Gruenheid *et al.* 1995). En base a la secuencia nucleotídica obtenida y al marco de lectura abierto, se estableció que se codifica un polipéptido de 60 kDa (Fig. 1), con 12 posibles pases transmembrana, un motivo conservado en proteínas de transporte, un sitio para N-glicosilación y múltiples sitios de fosforilación (Feng *et al.* 1997).

En el bovino, se han identificado solamente dos alelos del gen *Nramp1* en comparación con por lo menos seis en humanos (Horin *et al.* 1999; Searle y Blackwell, 1999; Graham *et al.* 2000). Utilizando una clasificación arbitraria de las lesiones macroscópicas se realizaron estudios de asociación de estas variantes en ganado tuberculoso; el estudio no encontró ninguna relación con la susceptibilidad a la tuberculosis, la estrategia resultó insuficiente para establecer un estudio serio de la asociación con la resistencia a la enfermedad (Barthel *et al.* 2000) y hasta el momento no se ha documentado alguna asociación entre este *locus* y la tuberculosis bovina. Lo anterior puede deberse a que el número y la extensión de las lesiones, es un parámetro aleatorio para ser empleado por sí solo en este tipo de estudios (Neill *et al.* 1988); ya que se sabe que tanto la virulencia de la bacteria, como la dosis implicada durante la infección natural, son determinantes en el desarrollo de lesiones e influyen directamente en su extensión, número y distribución en el animal infectado (Neill *et al.* 1994).

## II. JUSTIFICACION

La selección animal es una práctica común para el mejoramiento genético en la industria ganadera. En los países latinoamericanos en desarrollo, las enfermedades causadas por patógenos intracelulares tienen un importante impacto económico negativo para la ganadería y en algunos casos (como ejemplo, la tuberculosis bovina) no existen vacunas ni medicamentos efectivos para contrarrestar dicho impacto.

Debido a la importancia que implican estas enfermedades y a las pérdidas económicas que ellas representan, es necesario buscar nuevas y efectivas formas para el control de dichas enfermedades. La selección de animales resistentes a enfermedades es compatible con el uso de programas de vacunación y ésta, puede potenciar sus efectos. Como consecuencia, se esperaría reducir la incidencia de las enfermedades y a su vez, las pérdidas económicas ocasionadas por baja de la productividad, mortalidad o sacrificios asociados directamente con procesos patológicos infecciosos. Los niveles de resistencia, en las poblaciones de animales domésticos pueden ser manipulados con la implementación de programas de selección asistida por marcadores genéticos ligados a genes candidatos y con la introgresión de alelos previamente evaluados a las poblaciones animales.

La importancia de definir variantes alélicas en el presente trabajo, radica en que permite el análisis de fenómenos como la variabilidad genética y frecuencia de mutaciones en caracteres de interés. Así mismo, aporta la identificación de diferentes *loci* en el gen *Nramp1* para llevar a cabo nuevos estudios de asociación de éstos *loci* identificados, con la resistencia o susceptibilidad a enfermedades.

### III. OBJETIVOS E HIPOTESIS

#### 3.1. Objetivo general

Identificar variantes alélicas del gen *Nramp1* en bovinos de distintos linajes mediante análisis de microsatélites.

##### 3.1.1. Objetivos particulares

1. Elaborar un banco de ADN a partir de muestras de sangre o semen congelado provenientes de bovinos de diferentes linajes: *Bos taurus*, *Bos indicus*, criollos y cruza entre ellos.
2. Optimizar los ensayos de PCR para la amplificación de los microsatélites *Aro28* y *311-322* y su posterior evaluación en un secuenciador automatizado.
3. Determinar las frecuencias alélicas identificadas del gen *Nramp1* para cada uno de los microsatélites en las subpoblaciones estudiadas.
4. Evaluar las frecuencias alélicas en las subpoblaciones de estudio corroborando si se encuentran en equilibrio genético de Hardy-Weinberg.

#### 3.2. Hipótesis

El gen *Nramp1* presenta polimorfismos que pueden ser identificados en una población de bovinos de distintos linajes. Estas variantes genéticas serán útiles para definir su participación en la resistencia a patógenos intracelulares.

## IV. MATERIAL Y METODOS

El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología (CENID-M) que pertenece al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), dependencia a su vez de la Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) Carr. México-Toluca Km 15.5, col. Palo Alto; Cuajimalpa, D. F.; y en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), UNAM.

### 4.1. Animales

La población de estudio estuvo formada por 95 bovinos hembras y machos, clasificados de acuerdo a su linaje y raza conformada por: 34 animales europeos de 10 razas distintas (16 Holstein, 5 Simmental, 3 Suizo Americano, 2 Suizo Europeo, 2 Jersey, 2 Charolais, 1 Angus variedad rojo, 1 Limousin, 1 Belgian Blue y 1 Blond d' Aquitaine); 18 asiáticos de 4 razas distintas (6 Brahman, 5 Gyr, 5 Guzerat, y 2 Nelore); 20 Criollos lechero de Nayarit y 23 animales productos de cruce en las siguientes proporciones: 15  $\frac{1}{4}$  Holstein x  $\frac{1}{4}$  Cebú y 8  $\frac{1}{2}$  Guzerat x  $\frac{1}{2}$  Criollo lechero de Nayarit (Cuadro 1).

### 4.2. Purificación de ADN genómico

La purificación de ADN se llevó a cabo a partir muestras de semen con el método de Williams, previamente reportado (Williams *et al.* 1997) y modificado

en el laboratorio de biotecnología (Apéndice 1). Para el caso de muestras de sangre provenientes de hembras y machos, se utilizó el método empleado en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y bioestadística, FMVZ-UNAM (Apéndice 2).

**Cuadro 1.- Población de estudio**

	Línea	Función Zootécnica	Raza	No. de animales
1.	<i>B. taurus</i>	Leche	Holstein	16
2.	<i>B. taurus</i>	Leche	Simmental	5
3.	<i>B. taurus</i>	Leche	Suizo Americano	3
4.	<i>B. taurus</i>	Leche	Suizo Europeo	2
5.	<i>B. taurus</i>	Leche	Jersey	2
6.	<i>B. taurus</i>	Carne	Charolais	2
7.	<i>B. taurus</i>	Carne	Angus (rojo)	1
8.	<i>B. taurus</i>	Carne	Limousin	1
9.	<i>B. taurus</i>	Carne	Belgian Blue	1
10.	<i>B. taurus</i>	Carne	Blond D' Aquitaine	1
11.	<i>B. indicus</i>	Carne	Brahman	6
12.	<i>B. indicus</i>	Carne	Gyr	5
13.	<i>B. indicus</i>	Carne	Guzerat	5
14.	<i>B. indicus</i>	Carne	Nelore	2
15.	Criollo	Leche	C. Lechero Nayarit	20
16.	Cruza	Carne/leche	¼Holstein/¼Cebú	15
17.	Cruza	Carne/leche	½ Guzerat/½ Criollo Lechero	8
<b>TOTAL</b>				<b>95</b>

#### 4.2.1. Cuantificación

Posteriormente a la purificación, el ADN se cuantificó en un fluorómetro DQ200-115v (Hoefer Scientific Instruments) empleando el reactivo de Hoechst 33258 como marcador fluorescente. Las lecturas se hicieron tres veces, se promediaron y finalmente el producto de extracción se ajustó a una concentración de 50 ng/µl.

#### 4.2.2. Electroforesis

La calidad del ADN genómico fue evaluada por electroforesis en minigeles de agarosa al 1%, preparados con buffer TBE 1X (90 mM Tris-Ac. Bórico/2 mM EDTA pH 8.0). Se cargaron 200 ng de ADN y fueron sometidos a una corriente eléctrica de 90 volts durante 90 minutos. Para el corrimiento se utilizó una cámara de electroforesis horizontal y buffer TBE; empleando ADN Lambda digerido con la enzima *BstEII* como marcador de peso molecular. Al término del corrimiento electroforético, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/ml). La valoración de la purificación del ADN se realizó observando la fluorescencia de las bandas en un transiluminador con luz ultravioleta. De esta manera, fue creado un banco de muestras de ADN para llevar a cabo los ensayos de PCR.

#### 4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las condiciones de PCR se ajustaron a la máxima sensibilidad para evitar amplificaciones de fragmentos inespecíficos. Esto se logró realizando varios ensayos probando distintas temperaturas de alineación y concentraciones de  $Mg^{++}$ . Como templado se emplearon 100 ng de ADN de cada uno de los animales de la población y cada reacción se realizó por separado con cada par de oligonucleótidos, debido a la gran diferencia existente, para cada uno de ellos, entre la temperatura de alineación (56°C para *Aro28* y 62°C para *311-322*) y cantidad necesaria de  $Mg^{++}$  (2mM y 1.25mM respectivamente). Los ensayos se hicieron por duplicado para cada animal en un volumen final de 20 $\mu$ l bajo las siguientes condiciones:

### Condiciones de reacción:

Reactivo (concentración)	Concentración final	
	ARO 28	311-322
Buffer de reacción (10X)	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (30mM)	2.00 mM	1.25 mM
dNTPs (10mM)	0.2 mM c/u	0.2 mM c/u
Oligonucleótidos F y R (10µM)	0.4 µM c/u	0.4 µM c/u
Tritón (1%)	0.1%	0.1%
BSA (3mg/ml)	0.15 mg/ml	0.15 mg/ml
DNA genómico (50 ng/µl)	100 ng/reacción	100 ng/reacción
Taq polimerasa 5U/µl)	1.25U/reacción	1.25U/reacción
H2O	cbp 20 µl	cbp 20 µl

### Condiciones de amplificación para el termociclador:

#### **Aro28:**

1 ciclo (94°C, 3min); 30 ciclos (94°C, 30seg; 56°C,30seg; 72°C, 30seg); 1 ciclo (72°C,3min)

#### **311-322:**

1 ciclo (94°C, 3min); 30 ciclos (94°C, 30seg; 62°C,30seg; 72°C, 30seg); 1 ciclo (72°C,3min)

### 4.3.1. Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos (F y R), con el propósito de ser utilizados para la amplificación por PCR de las regiones donde se localizan los microsatélites *Aro28* y *311-322*; tomando en cuenta que *Aro28* se encuentra ubicado a aproximadamente 0.8 cM hacia el extremo 5' del gen *Nramp1* (región flanqueadora) y *311-322* en el extremo 3' (región no traducida: UTR) entre los nucleótidos 1745 y 1955 del gen *Nramp1* del bovino. Ambos microsatélites presentan predominantemente una secuencia del tipo dinucleótido GT y se

consideró su posible utilidad como marcadores genéticos del *locus* mencionado (Fig. 2). Los iniciadores delanteros (Forward: F) *Aro28F* y *311F* fueron conjugados con marcadores fluorescentes que consisten en fluorocromos denominados HEX@*Aro28F* y FAM@*311F*; esto con el objeto de ser detectados por el secuenciador durante el análisis de microsatélites. Los iniciadores de reversa (Reverse: R) *Aro28R* y *322R*, no fueron marcados. En el Cuadro 2 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos específicos que se diseñaron; estos fueron utilizados como iniciadores durante la amplificación por PCR.

**Cuadro 2.- Oligonucleótidos**

Nombre	Secuencia del oligo	Tamaño esperado
<b>311-322</b> <i>311F</i> <i>322R</i>	5' GAT TTC TCT AGT GAG TAA CA 3' 5' TCT TGC CCA GAT GTT CTT AG 3'	223pb
<b>Aro28</b> <i>Aro28F</i> <i>Aro28R</i>	5' GGA ATG AGT GGG CAC AGT GGC 3' 5' CCT TTC AGA ACT CCC TCT CCG 3'	256/270pb

#### 4.3.2. Electroforesis de productos de PCR

Una vez amplificados los fragmentos de interés, también fueron evaluados mediante electroforesis horizontal en minigeles de agarosa. A diferencia del ADN genómico, esta vez se utilizó agarosa a una concentración de 2.5% en TBE 1X por tratarse de fragmentos mucho más pequeños; utilizando como marcador de peso molecular ADN pBR322 digerido con la enzima *MspI*. Se emplearon el mismo buffer, tiempo y voltaje para su corrimiento. Después del corrimiento electroforético, cada gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5mg/ml) y visualizados mediante luz ultravioleta para su valoración.

#### 4.4. Preparación de productos amplificados para su análisis

Después de los ensayos de PCR se procedió a mezclar 1µl de cada producto de amplificación (*Aro28* y *311-322*) de cada animal. Además, a cada mezcla se añadieron 0.5 µl del fluorocromo TAMRA, utilizado como marcador de peso molecular en el secuenciador automático y donde se observó de tonalidad roja; finalmente cada mezcla se llevó hasta los 30µl con formamida desionizada (SIGMA) en minitubos de ensayo (ependorf) de 0.5 ml. Los microsatélites amplificados y mezclados se utilizaron para su corrimiento en un secuenciador automático.

##### 4.4.1 Identificación y tamaño de alelos

El tamaño de los microsatélites se determinó mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI-prism 310 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Branchburg, NJ) y fue analizado con la ayuda del programa de software Gene Scan 672 V2.0.2 (Applied Biosystems), con lo que se obtuvo el tamaño de los alelos mediante la observación de los electroferogramas (Fig. 7). Así mismo, con la intención de verificar los resultados se realizaron 3 distintas lecturas de las mezclas, después de su procesamiento en el secuenciador.

Para estimar el tamaño de los alelos se tomaron en cuenta los siguientes puntos: 1) tamaños reportados para los alelos; 2) la curva patrón con el marcador TAMRA; y 3) la inclusión de dos controles clonados y secuenciados de los alelos, por cada 38 lecturas.

De esa manera, con la amplificación de los marcadores en ambos flancos del *locus*, se procedió a la genotipificación de una población de bovinos que se consideró, podría ser suficientemente diversa para lograr encontrar variantes en estos dos *loci*.

La frecuencia alélica y la heterocigocidad en cada *locus* y población, fueron obtenidas utilizando el paquete de análisis computacional "Genes in populations" versión 2 (B May y CC Krueger, Cornell Laboratory for Ecological and Evolutionary Genetics, Cornell University, Ithaca, NY). La heterocigocidad observada ( $H_o$ ), la heterocigocidad esperada ( $H_s$ ) y el índice de fijación ( $F_{is}$ ), necesarios para calcular  $\chi^2$  y el equilibrio de Hardy-Weinberg, fueron calculados usando el paquete DISPAN (T. Ota, Institute of Molecular Evolutionary Genetics, The Pennsylvania State Univ., University Park).

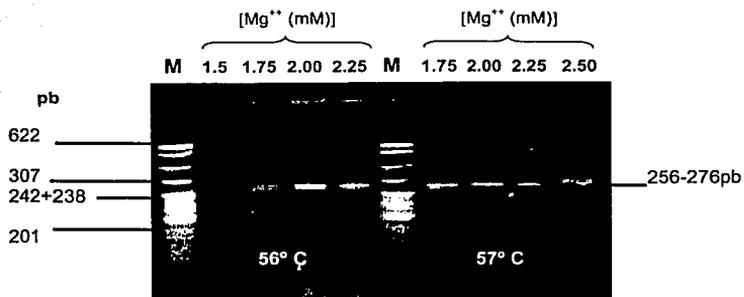
## V. RESULTADOS

En la Fig. 3 se observan los productos de extracción de ADN genómico homogenizados a 50 ng/ $\mu$ l en base a los resultados de la cuantificación en un gel de agarosa al 1%.

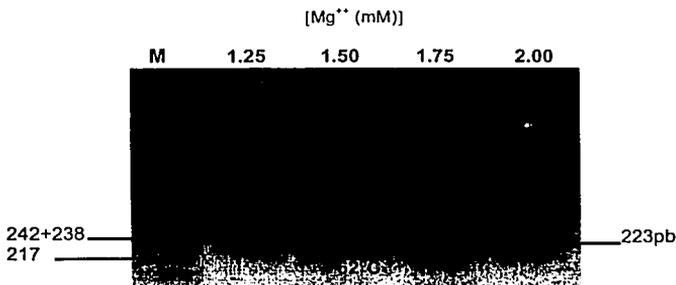


**Figura 3.-** Electroforesis de ADN genómico diluido y homogenizado a 50 ng/ $\mu$ l. M indica el carril para el marcador de peso molecular (ADN Lambda/BstEII), la numeración superior corresponde a la identificación del animal y el número de la izquierda corresponde al peso molecular del mayor de los fragmentos del marcador.

La estandarización de las condiciones de PCR, indicaron que para *Aro28* del extremo 5', la cantidad óptima de  $MgCl_2$  fue de 2mM en concentración final de cada reacción (Fig. 4) y para 311-322 correspondiente al extremo 3' del *locus Nramp1*, fue de 1.25mM en concentración final (Fig. 5).



**Figura 4.-** Electroforesis del microsatélite *Aro28* amplificado por PCR, con distintas concentraciones de  $Mg^{++}$  (numeración superior) y 2 diferentes temperaturas (inferior). M indica el carril para el marcador de peso molecular (ADN pBR322/*MspI*), la numeración de la izquierda, corresponde al peso molecular de algunos fragmentos del marcador de peso. El tamaño esperado de los fragmentos amplificados (derecha) era desde 256 hasta 270pb.



**Figura 5.-** Electroforesis del microsatélite *311-322* amplificado por PCR. Se emplearon distintas concentraciones de  $Mg^{++}$  (numeración superior) y se consideraron 62°C como temperatura de alineación (inferior). M indica el carril para el marcador de peso molecular (ADN pBR322/*MspI*), la numeración de la izquierda, corresponde al peso molecular de algunos fragmentos del marcador de peso y el tamaño esperado de los fragmentos amplificados (derecha) era 223pb.

En la Fig. 6 se visualizan algunos fragmentos amplificadas con cada par de oligonucleótidos utilizados sobre muestras de dentilla e ADN purificado de las muestras de sangre y semen.

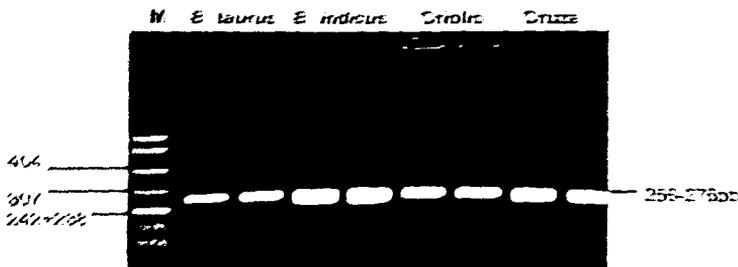


Figura 6.- Amplificación de microsatélite Aro 28 amplificado por PCR. Como template se utilizaron ADN de semen (Europeo y Asiático) y sangre (control y crux). El marcador de peso molecular utilizado fue pBR322 MspI. Numeración en base de pares de nucleótidos a peso molecular de los fragmentos de marcador. El tamaño, expresado de los fragmentos amplificados (derecha), independientemente de origen de la muestra va desde 256 hasta 276pb.

### 5.1 Frecuencia alélica y de heterocigotos en la población de estudio

Después del análisis de microsatélites con el programa Gene Scan, los tamaños de los alelos se leyeron en ventanas diferentes: Aro28 (HEX) en la negra, 311-322 (FAM) en la azul y el marcador de peso TAMRA en la roja (Fig. 7). En este caso la muestra corresponde a un animal heterocigoto para ambos loci, ya que se observan dos diferentes tamaños de alelo para ambos microsatélites. Cuando un pico baja para volver a subir en uno de mayor tamaño, es denominado fantasma o "slutter" y no es considerado como un

alelo verdadero, tal es el caso de el *locus* 311-322 donde se observa un tercer pico antes del alelo de 223pb.

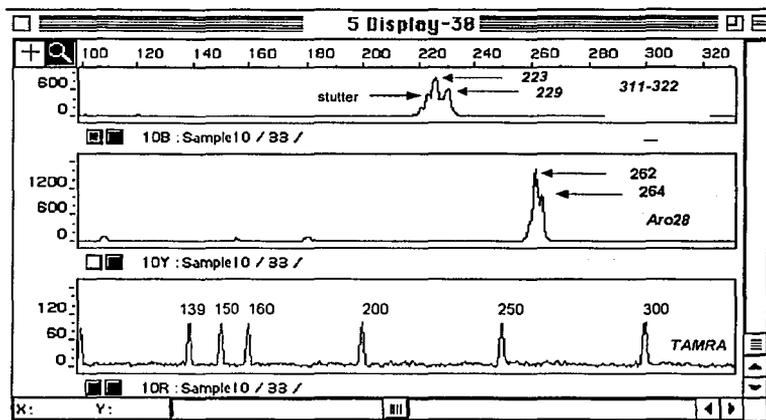


Figura 7.- Análisis de microsatélites con el programa Gene Scan, donde se observan los alelos encontrados para el *locus* 311-322 en la ventana superior (10B); el primer pico corresponde a un alelo de 223 pb y el segundo a uno de 229pb. La segunda ventana (10Y) contiene Los alelos encontrados para el *locus* Aro28, donde se encuentran definidos dos picos, los cuales corresponden a un alelo de 262pb y uno de 264pb. La ventana inferior (10R), muestra los picos que corresponden al marcador de peso molecular TAMRA y en la parte superior de cada uno de ellos su peso correspondiente.

Se obtuvieron en total 17 alelos (12 para *Aro28* y 5 para *311-322*), de los cuales, solo habían sido reportados 9 (8 para *Aro28* y 1 para *311-322*) Las frecuencias alélicas para la población de estudio se presentan en el Cuadro 3, donde por motivos de análisis y debido a la diversidad de los individuos que las conforman, los grupos de Europeos y Cruzas se separaron en subgrupos, ya que en el primer caso, casi la mitad de la población es de la raza Holstein y en el segundo caso tienen un origen muy diferente ( $\frac{1}{2}$  Guzerat x  $\frac{1}{2}$  Criollo lechero y  $\frac{3}{4}$  Europeo x  $\frac{1}{4}$  Asiático). Así mismo se muestra el número de alelos heterocigotos por *locus* y por población. Ambos *loci* fueron polimórficos y el

número total de alelos detectados varió ampliamente. Considerando ambos *loci* se encontraron en total 17 alelos, donde se observaron frecuencias que van desde 1 para los alelos 1, 3 y A del *locus* Aro28 hasta 109 para el alelo 2 del 311-322.

**Cuadro 3. Frecuencias alélicas y número de heterocigotos por *locus* y por población**

<i>locus</i>	Alelo	Tamaño (pb)	Europeos		Holstein		Asiáticos		Criollos		Guzzeri		Cruzas		Total alelos	No. het
			f alelos	het	f alelos	het	f alelos	het	f alelos	het	f alelos	het	f alelos	het		
Aro 28	1	246	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
Aro 28	2	254	0	0	0	0	11	9	8	8	1	1	5	3	25	21
Aro 28	3	256	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
Aro 28	4	258	1	1	0	0	5	5	2	2	4	4	3	1	15	13
Aro 28	5	260	17	3	8	2	9	7	18	13	5	5	13	3	68	33
Aro 28	6	262	4	2	19	3	8	8	5	5	2	2	3	3	41	23
Aro 28	7	264	8	4	5	3	1	1	2	2	3	3	4	2	23	15
Aro 28	8	266	2	2	1	1	0	0	1	1	0	0	2	0	6	4
Aro 28	9	268	2	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	3
Aro 28	A	270	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Aro 28	B	280	0	0	0	0	0	0	2	2	1	1	0	0	3	3
Aro 28	C	288	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
311-22	1	221	4	2	6	2	1	1	0	0	2	2	0	0	13	7
311-22	2	223	22	4	21	3	16	10	24	12	6	4	20	8	109	39
311-22	3	225	9	1	5	1	4	2	9	9	1	1	1	1	29	15
311-22	4	227	1	1	0	0	14	10	7	7	4	2	6	4	32	24
311-22	5	229	0	0	0	0	1	1	0	0	3	1	3	1	7	3
	N	18			16		18		20		8		15		95	
	Total de alelos	72			64		72		80		32		60		380	
	Promedio	4.2			3.8		4.2		4.7		1.9		3.5		22.4	
	Total de heterocigotos		22		16		56		62		26		24		206	

N: Animales estudiados.

<sup>1</sup> Total de alelos encontrados en cada población.

<sup>2</sup> Promedio de alelos encontrados por población.

<sup>3</sup> Total de heterocigotos por población.

<sup>4</sup> Número de alelos encontrados por *locus* en todas las poblaciones.

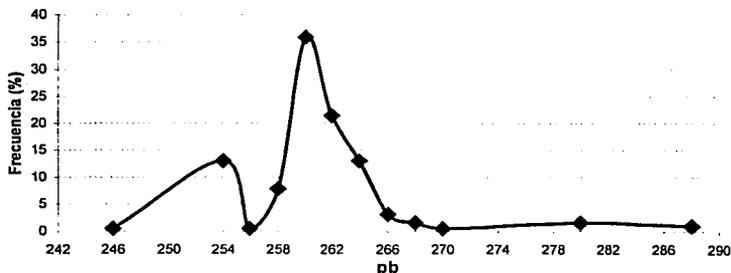
## 5.2. Heterocigocidad de la población

Los valores de heterocigocidad (Ho y Hs) y el valor Fis (índice de fijación) representados por la población se muestran en el Cuadro 4; aquí también se muestran los resultados por *locus* y población de la prueba de  $\chi^2$  con 1 grado de libertad y 95% de confianza. Los valores de  $\chi^2$  más altos se encontraron en la población de animales Europeos para el *locus* 311-322, con valores por

### 5.3. Frecuencia y porcentaje de heterocigocidad de los alelos identificados para el *locus Aro28*

Los alelos que se presentaron con mayor frecuencia fueron el 5 y 6 con el 36.3 y 21.6% respectivamente, seguidos del 2 y 7, con 13.6 y 12.11% respectivamente. El 66% de los animales en la población de estudio fueron heterocigotos para el *locus Aro28*. Los alelos 1, 3, 9, A y B se presentaron siempre en forma heterocigota y los demás por encima del 60% de las ocasiones, exceptuando al alelo 5 con el 48% y C, que solo se presentó en 1 animal homocigoto en esta población de estudio (Fig. 8).

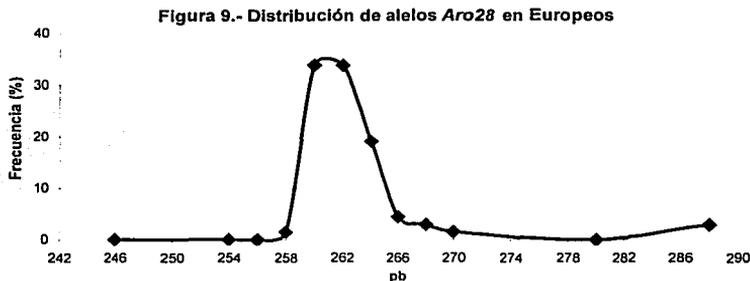
Figura 8.- Distribución de alelos *Aro28* en la población



Para este *locus* se identificaron 12 alelos distintos en el total de la población, (246, 254 a 270, 280 y 288pb), los que fueron asignados con los números del 1 al 9 y las letras A, B y C. Los alelos 1 de 246 pb, B de 280 y C de 288 no habían sido previamente descritos.

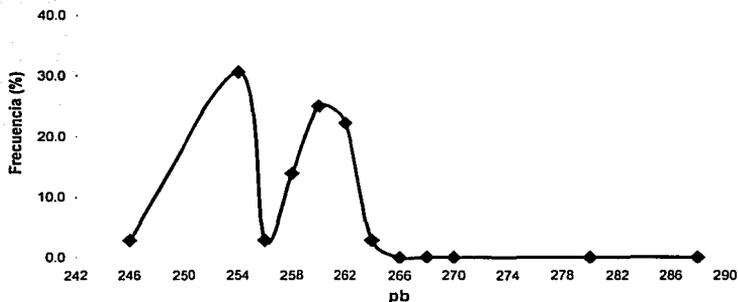
En la población de bovinos europeos (Fig.9) se presentaron los alelos del 4 al A, de 258 hasta 270pb y el C de 288pb. El alelo A solo se presentó en un animal de esta población en todo el estudio. Los alelos 5, 6 y 7 fueron los más

representados en esta población, los dos primeros con una frecuencia de más del 30% cada uno y el tercero con el 19.1%. Estos tres alelos también estuvieron más representados en la población heterocigota, con aproximadamente el 10% cada uno. Solamente el 35.3% de los individuos Europeos, fueron heterocigotos para este *locus*. Los alelos 4, 8, 9 y A se presentaron en todos los casos en animales heterocigotos.



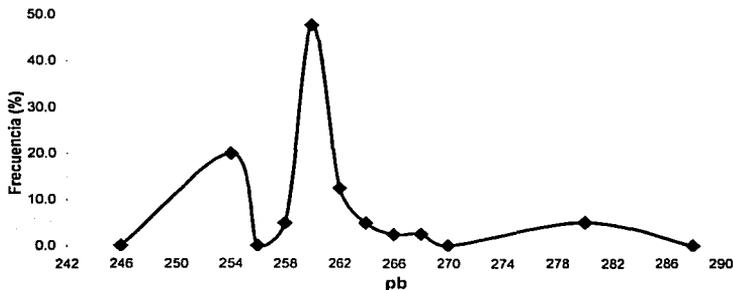
En la población de bovinos asiáticos (Fig. 10) se encontraron los alelos 1 al 7, incluyendo el 1, 3 y 7 de 246, 256 y 264pb, respectivamente. De estos, el 1 y 3 solo se presentaron, cada uno, en un animal diferente de esta población en todo el estudio. Los alelos 2, 5 y 6 fueron los más representados con tamaños desde 254pb, 260pb y 262pb, con frecuencias alrededor del 25%. El alelo 2 fue el más frecuente con el 30.6% seguido, en orden descendente, del 5, 6 y 4, los dos primeros con más del 20% y el 4 con cerca del 14%. Estas frecuencias fueron muy similares a las encontradas en la población heterocigota. Los alelos 1, 3, 4, 6 y 7 se presentaron en todos los casos en animales heterocigotos. Más de tres cuartas partes de la población de bovinos asiáticos fueron heterocigotos para este *locus*, específicamente el 88.9%.

Figura 10.- Distribución de alelos *Aro28* en Asiáticos



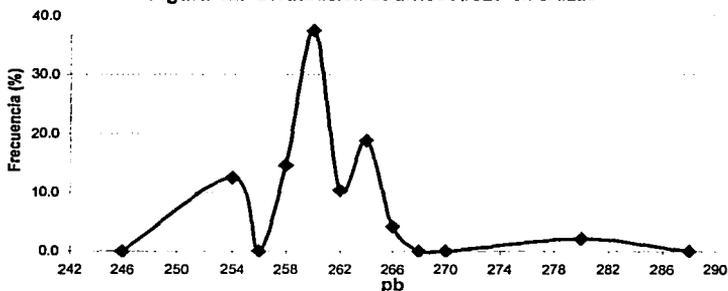
En los animales criollos (Fig. 11) se encontraron los alelos del 4 al 9, así como, el 2 y el B. Los más frecuentes en orden fueron el alelo 5 con el 47.5%, el alelo 2 con el 20% y el 6 con el 12.5%. Así mismo, las frecuencias en la población heterocigota fueron muy similares. Todos los alelos a excepción del alelo 5 se presentaron, en todos los casos, en animales heterocigotos. El 85% de los animales criollos fueron heterocigotos para este *locus*.

Figura 11.- Distribución de alelos *Aro28* en Criollos



En la población conformada por animales producto de cruces se presentaron los alelos 4 al 8, así como el 2 y el B. Los más frecuentes fueron el alelo 5 con el 39.1% y el 4 y 7 con el 15.2%, seguidos del 2 con el 13% y el 6 con el 10.9%. La distribución de todos los alelos encontrados en la población heterocigota fue homogénea con aproximadamente el 10% para cada alelo, exceptuando al alelo 8, que se presentó solo en dos animales homocigotos y al B que se encontró en uno heterocigoto. El alelo 6 sólo se encontró en animales heterocigotos. En general, el 60.9% de la población de cruces fueron heterocigotos para este *locus*.

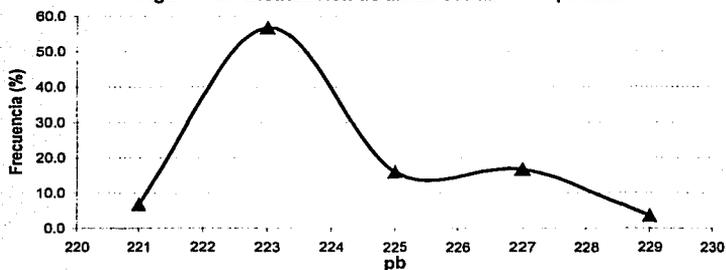
Figura 12.- Distribución de alelos *Aro28* en cruces



#### 5.4 Frecuencia y heterocigocidad de los alelos identificados para el *locus* 311-322

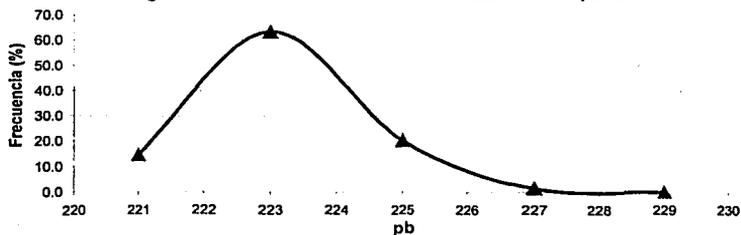
Se identificaron 5 alelos distintos en el total de la población, que van desde 221pb hasta 229pb. El alelo No. 2 de 223pb tuvo una frecuencia de 57.4% en la población total y mayor al 20% en el total los heterocigotos. Los alelos 3 y 4 tuvieron una frecuencia cercana al 16% cada uno, mientras que para los alelos 1 y 5 fue menor: 6.8% y 3.7% respectivamente (Fig.13). Para este *locus* el 45.8% de los animales en la población de estudio fueron heterocigotos.

Figura 13.- Distribución de alelos 311-22 en la población

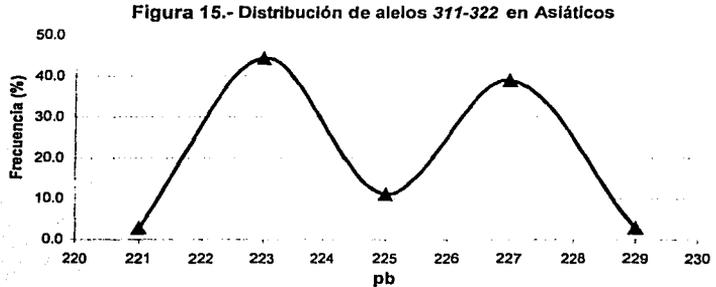


En la población de bovinos europeos (Fig. 14), se presentaron los alelos del 1 al 4, de 221 hasta 227pb. El alelo 2 de 223pb fue el más representado, con el 63.2%, seguido del 3 con 20.6% y del 1 con 14.7%. El alelo 2 fue también el más representado en los animales heterocigotos de esta población con el 10.3%. Para los alelos 1 y 3, la frecuencia fue cercana al 6% y 3%, respectivamente, mientras que, dentro de este *locus* no se presentaron casos de heterocigotos para el alelo 4. Los alelos 2 y 3 presentaron alrededor de un 15% de heterocigocidad, mientras que el 1 presentó el 40%. Solamente el 19.1% de los individuos Europeos fueron heterocigotos para este *locus*.

Figura 14.- Distribución de alelos 311-322 en Europeos

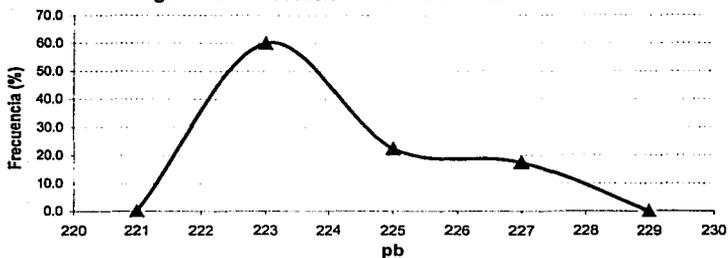


En la población de bovinos asiáticos (Fig. 15) se presentaron todos los alelos identificados en este *locus*. El alelo 5 de 229pb, no estuvo presente en europeos ni en criollos. En esta población, los alelos 2 y 4 fueron los más representados, con aproximadamente el 40% cada uno, en cerca del 28% de la población heterocigota y ambos con una heterocigocidad mayor al 60%. Los alelos 1 y 5 se presentaron en una sola ocasión cada uno y esto, en animales heterocigotos. Dos tercios de esta población fue de heterocigotos para este *locus*, específicamente el 66.7%.



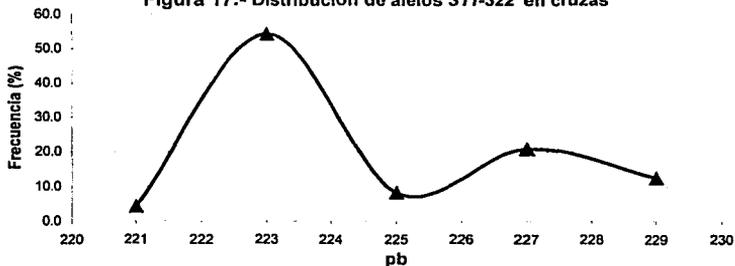
En los animales criollos (Fig.16), solamente se presentaron los alelos del 2 al 4, es decir, desde 223pb hasta 227pb. El 2 fue el más frecuente con el 60%, seguido de los alelos 3 y 4 con una frecuencia de 22.5% y 17.5%, respectivamente. El 70% de los animales criollos fueron heterocigotos para este *locus*. El alelo 2 se presentó en el 30% de los heterocigotos y tuvo una heterocigocidad del 50%. Los alelos 3 y 4 se presentaron solamente en individuos heterocigotos.

Figura 16.- Distribución de alelos 311-322 en criollos



En la población conformada por animales producto de cruza (Fig.17), se presentaron los cinco alelos identificados, siendo el más frecuente el 2 de 223pb (56.5%) seguido del 4 de 227pb (17.4%), el 5 de 229pb (13%), el 3 y el 1, que se presentaron con menos del 10% y 5% de frecuencia respectivamente. El alelo 1 de 221pb sólo se presentó en dos individuos heterocigotos, mientras que el alelo 4 fue 75% heterocigoto seguido del 3 (50%), el 2 y el 5, ambos alrededor del 35%. El 47.8% de individuos en esta población fueron heterocigotos para este *locus*.

Figura 17.- Distribución de alelos 311-322 en cruza



Los alelos más representativos del *locus* 311-322 fueron el 2, 3 y 4 mismos que, en conjunto se presentaron en más de 2 tercios de la población. En la población de bovinos criollos no se presentaron los alelos 1 ni 5, este último tampoco estuvo presente en los europeos.

En resumen, los alelos más representativos del *locus* 311-322 en toda la población fueron el 2, 3 y 4 pero el 4 estuvo prácticamente ausente en los europeos. Estos alelos abarcaron más del 75% de la población. Así mismo, para el caso del *locus* *Aro28*, los alelos más representativos, fueron el 5 y 6 que en conjunto tuvieron más del 55% de la población, así como el 2 y el 7 con más del 25%; el alelo 2 casi no se encontró en los europeos, mientras que, en los asiáticos y en los criollos el 7 estuvo menos representado. Los alelos menos representados del *locus* 311-322 fueron el 1 y el 5, y para el *Aro28* los alelos 1, 3, 4, y del 8 al C. Todos los alelos descritos para el *locus* 311-322 tuvieron frecuencias mayores al 3%, mientras que para el *locus* *Aro28*, los alelos 1, 3 y A, las frecuencias fueron del 1%.

#### 5.5. Frecuencia y heterocigocidad de los genotipos identificados

La genotipificación de la población de bovinos del estudio, se obtuvo amplificando los marcadores en ambos flancos del gen *Nramp1*. Los genotipos obtenidos se expresaron presentando primero el *locus* *Aro28* del extremo 5' y después el 311-322 del extremo 3' y se presentan en el Cuadro 5.

En los 95 animales de estudio se identificaron 55 genotipos distintos; de los cuales se identificaron en Europeos 32.7%, en Asiáticos 27.30%; en Criollos 29.1% y en Cruzas 40%. De los genotipos en toda la población se encontraron las siguientes frecuencias: heterocigotos para ambos *loci*, 23 he/he; heterocigotos para *Aro28* y homocigotos para el 311-322, 15 he/ho; homocigotos para ambos *loci*, 9 ho/ho; y homocigotos para *Aro28* y

heterocigotos para 311-322, 8 ho/he; es decir, 23:15:9:8. En los europeos se encontraron 19 diferentes genotipos en la siguiente proporción: 2 he/he, 8 he/ho, 5 ho/ho y 4 ho/he (en porcentaje: 10.5: 42.1: 26.3: 21.1); en los asiáticos fueron 15 y la proporción fue de 9:4:1:1 (60.0: 26.7: 6.7: 6.7); en los criollos fueron 16 con la proporción de 9:4:1:2 (56.3: 25.0: 6.3: 12.5); y para los productos de cruza un total de 22 y en una proporción de 6:6:6:4 (27.3: 27.3: 27.3: 18.2).

**Cuadro 5.- Frecuencias Genotípicas**

he/he	f	he/ho	f	ho/ho	f	ho/he	f
2/3-2/4	1	1/5-2	1	2-2	1	4-2/4	1
2/4-2/4	2	2/5-2	4	2-4	1	5-1/2	1
2/5-1/2	1	2/6-3	1	5-2	8	5-2/3	4
2/5-2/3	1	4/5-2	2	5-5	1	5-2/4	1
2/5-2/4	4	4/6-2	2	6-1	1	5-2/5	1
2/5-3/5	1	4/7-2	1	6-2	7	5-3/4	2
2/6-1/2	1	4/7-5	1	7-2	1	7-2/3	1
2/6-2/4	3	5/6-1	1	7-3	2	8-2/4	1
2/7-2/4	2	5/6-2	4	C-1	1		12
4/5-1/3	1	5/6-4	2		23		
4/5-2/3	1	5/7-2	2				
4/5-2/4	2	6/9-2	1				
4/6-2/4	1	7/6-3	2				
5/6-1/2	1	7/1A-3	1				
5/6-2/3	1	7/1B-4	1				
5/6-2/4	2	8/9-3	1				
5/6-2/5	1		27				
5/7-1/2	1						
5/8-2/3	1						
6/7-1/2	1						
6/7-2/4	2						
7/1B-3/4	1						
8/9-2/4	1						
	33						

he/he: Heterocigoto para ambos loci.

he/ho: Heterocigoto para Aro28 y homocigoto para 311-322

ho/ho: Homocigoto para ambos loci.

ho/he: Homocigoto para Aro28 y heterocigoto para 311-322.

f: Frecuencia (número de animales que presentaron el genotipo).

/: Divide los dos alelos del locus.

.-: Divide un locus de otro.

El 41.1% de los animales de la población total fueron heterocigotos para ambos *loci*, expresado como he/he; el 28.6% he/ho; el 14.3% ho/he; y el 16.1% ho/ho. La proporción de animales heterocigotos para ambos *loci* he/he fue mayor al 55% en Asiáticos y Criollos, del 27% en las cruzas y del 10% en Europeo; en los distintos linajes la proporción de he(*Aro28*)/ho(*311-322*) se mantuvo cercana al 25% excepto para los Europeos, en donde llegó hasta el 42%; la proporción de ho/he fue mayor en Europeos 21.1% y menor en Asiáticos 6.7%, en criollos y cruzas fue de 12.5% y 18.2%, respectivamente. En los animales Europeos y en las cruzas, así como en los Asiáticos y Criollos la proporción de animales homocigotos para ambos *loci* (ho/ho) fue similar; para los primeros fue mayor al 25% y para los segundos menor al 7%.

#### 5.6. Haplotipos identificados

A la combinación de alelos que se encuentran en el mismo cromosoma se le conoce como haplotipo. Los haplotipos identificados en la población fueron obtenidos en relación a los genotipos de los animales agrupados por *locus* en la forma siguiente: alelos *Aro28*/ alelos *311-322*. En la población total se encontraron 28 haplotipos diferentes, de los cuales 14 se presentaron en Europeos, 10 en asiáticos, 7 en criollos y 15 en las cruzas (Cuadro 6).

Quando el genotipo es heterocigoto para ambos *loci*, no es posible determinar un haplotipo verdadero si no se cuenta con los datos de los padres. Los haplotipos "virtuales" (considerados así por los animales que presentan genotipos he/he para los dos *loci*), serían: para la población 32; en Europeos 6; en Asiáticos 18 y en Criollos 17.

**Cuadro 6.- Haplotipos identificados en la población**

<b>No. Haplotipo</b>		<b>No. Haplotipo</b>	
1	1/2	15	6/3
2	2/2	16	6/4
3	2/3	17	7/2
4	2/4	18	7/3
5	4/2	19	7/4
6	4/4	20	7/5
7	4/5	21	8/2
8	5/1	22	8/3
9	5/2	23	8/4
10	5/3	24	9/2
11	5/4	25	9/3
12	5/5	26	A3
13	6/1	27	B/4
14	6/2	28	C/1

No.: Número consecutivo del haplotipo.

Haplotipo: Alelo Aro28/Alelo 311-322.

## VI. DISCUSION

En este trabajo se planteó la búsqueda de variantes alélicas del *locus Nramp1* para lo cual se emplearon dos marcadores moleculares tipo microsatélite dinucleótido (específicamente GT); que se localizan en ambos flancos del *Nramp1* (Fig. 2). Para el *locus Aro28*, en el extremo 5' se hablan reportado solo 8 alelos, desde 256 hasta 270pb, cuyas diferencias comparando el inmediato superior y el inferior son de tan solo una unidad de repetición (UR) (Horin *et al.* 1999). Empleando los mismos oligonucleótidos utilizados en los reportes mencionados, se identificaron 4 alelos diferentes a los ya reportados y cuyos tamaños fueron de 246, 254, 280 y 288pb. En orden ascendente, estos nuevos alelos se enumeraron como 1, 2, B y C; al graficar la frecuencia de los alelos para *Aro28* (y) contra el tamaño de los mismos (x), la curva se prolonga preferentemente hacia los alelos de mayor tamaño (Fig. 9). Esta variación, probablemente provocada por un desplazamiento (slippage) de la polimerasa al ir colocando bases en la cadena naciente, al momento de la replicación (Goldstein y Schlötterer, 1999), ya que al parecer, aumenta y no disminuye el número de repetidos en los alelos nuevos.

En la población de bovinos Europeos se presentaron únicamente los alelos del 4 al A, y el alelo A solo en un animal, en este grupo y en todo el estudio. Además cerca del 65% de estos animales fueron homocigotos para este *locus*. Lo anterior, indica una población sumamente homocigota posiblemente asociada con la selección intensiva que promueve la endogamia del ganado productor de leche de raza Holstein. En los Asiáticos se presentaron los alelos del 1 al 7, el alelo 1 y el 3, de la misma forma que el 1 en los Europeos, sólo se presentaron cada uno en un animal. A diferencia de los Europeos, casi el 90% de los bovinos de esta población fueron heterocigotos para este *locus*. No obstante, tanto en Europeos como en Asiáticos se mantuvo la diferencia de

sólo una UR entre alelos. En el caso de los Criollos se presentaron alelos consecutivos del 4 al 9, pero se encontraron también el 2 y el B, el alelo 2 con una frecuencia del 20%, solo superado por el alelo 5 representado en cerca del 50% de esta población, y el 85% de fue heterocigoto. La población de cruzas se comportó de forma muy similar a la de criollos, ya que se presentaron los alelos del 4 al 8, el 2 y el B; cerca del 60% de la población fue heterocigota para este *locus*. Los alelos más frecuentes fueron el 2, 5, 6 y 7; el primero, ausente en Europeos.

Por otra parte, los alelos nuevos varían notablemente; el 1 es 4 unidades de repetición (4UR u 8pb) menor al 2, el B es 5 UR (10pb) mayor que el A y el C es 4 UR mayor al B. Estas diferencias podrían deberse a mutación o incluso a eventos de recombinación; además, tomando en cuenta la ausencia de los alelos intermedios, se supuso que dichos alelos podrían estar presentes en otras razas o en bovinos no incluidos en la población estudiada.

No obstante, el enorme polimorfismo del *locus Aro28*, fueron marcadas claramente algunas diferencias entre los linajes, dadas por la presencia y frecuencia de los alelos descritos, mismas que asocian al ganado Asiático y Europeo con una mayor homogeneidad, aún a pesar de la diferencia tan marcada en la heterocigocidad entre ambos grupos. Mediante los resultados obtenidos para éste *locus*, también se puede observar una relación mucho más fuerte entre criollos y cruzas, diferenciándolos de las poblaciones mencionadas al parecer más homogéneas; pero, para el caso de los criollos se consideró que podrían contener alelos ancestrales o ya perdidos en las poblaciones actuales (Lemus *et al.* 2001; Giovambattista *et al.* 2001; Camus *et al.* 1996) resurgidos ahora, por efecto del cruzamiento (en los animales producto de cruzas).

Se observó una pérdida de heterocigocidad en la población de Europeos y en las cruzas (de Europeos con Asiáticos) mientras que, tanto los Criollos como los Asiáticos, mantuvieron dicha heterocigocidad.



Los resultados en el presente trabajo mostraron la presencia de 5 alelos distintos en la población de estudio, desde 221 hasta 229pb. Los alelos menos representados, tuvieron una frecuencia mayor al 3%, lo cual deja pocas dudas acerca de su autenticidad *per se*. Los 5 alelos tuvieron una diferencia homogénea de 2pb lo cual nos hace pensar en una sola UR, aun con el antecedente mencionado, y será solo hasta la secuenciación de los mismos donde se demuestre finalmente el mecanismo de mutación para estos alelos. Al observar las frecuencias más bajas para los alelos 1 y 5, se puede inferir que esta región evoluciona por ambos extremos, debido al desplazamiento de bases tanto en la cadena templado como en la naciente.

En los resultados finales se observa que el alelo 2 está presente en más del 55% de la población final y que los alelos 3 y 4 tienen la misma frecuencia (16%), estando estos tres alelos representados en más de dos tercios de la población. Los alelos previamente descritos para este *locus* fueron encontrados en bovinos Europeos, el segundo de ellos en una raza local (Horin *et al.* 1999; Giovambattista *et al.* 2001; Rincon *et al.* 2000), dichos hallazgos no provenían de un análisis de frecuencias en una población; por tanto, se esperaría que los alelos más frecuentemente encontrados en este estudio, correspondan a dichos alelos.

Cerca de la mitad de la población total fue heterocigota para el *locus* 311-322 y el alelo más frecuente fue el menos heterocigoto. En los Europeos se presentaron los alelos del 1 al 4 y dado que solamente una quinta parte de estos bovinos fueron heterocigotos, hubo un bajo índice de heterocigocidad para éstos alelos. El alelo 2 fue el más frecuente tanto en Europeos como en criollos mientras que, el alelo 5 se presentó únicamente en bovinos Asiáticos y en las cruza.

Más de dos tercios de los bovinos Asiáticos y producto de cruza fueron heterocigotos y menos de la mitad, en los criollos. En los asiáticos, los alelos 1 y 5, se presentaron sólo en una ocasión y en animales heterocigotos, y los alelos 2 y 4 fueron los más frecuentes pero en igual proporción, a diferencia de

los demás linajes donde el 2 fue siempre el más frecuente por una diferencia mayor a 30%. En los criollos se observa un comportamiento similar al del total de la población, en cuanto a la mayor frecuencia de los alelos 2, 3 y 4. En las cruzas, en orden descendente de frecuencia, se presentaron más, los alelos 2, 4 y 5, éste último tuvo su mayor frecuencia en esta población.

Aun cuando el microsatélite 311-322 es mucho menos polimórfico que el *Aro28*, las curvas obtenidas permiten concluir cuestiones similares, en tanto que, en los Europeos y en las cruzas, hay una pérdida de heterocigocidad. Sin embargo, se observó una diferencia con el *locus Aro28*, donde no se encontró un alelo fijado (o en vías de serlo) en toda la población (Avraham *et al.* 1993). En este *locus*, el alelo 2 tiene claramente un origen ancestral, ya que está presente en cada uno de los linajes. Por último, se consideró que el alelo 4, al parecer, se origina de los bovinos Asiáticos, el alelo 1 en los Europeos y el 5 en las cruzas.

En diversos proyectos se ha considerado que la inclusión de al menos 25 animales por grupo estudiado, puede ser suficiente para la búsqueda de polimorfismos y variantes alélicas de un *locus* dado (FAO, 1998). No sin tomar en cuenta lo anterior, que la población empleada es relativamente pequeña, ya se puede plantear que la frecuencia de mutación en una de las cadenas de ADN podría diferir en relación al linaje o tal vez, con la especie como ha sido demostrado (Jobse *et al.* 1995; Goldstein y Schlötterer, 1999). El efecto de los polimorfismos localizados en los extremos 5' de diversos genes está hoy en día, plenamente demostrado, independientemente de si estos se localizan dentro de la región promotora mínima, a cientos o hasta a miles de pares de bases de distancia (Jobse *et al.* 1995; Goldstein y Schlötterer, 1999). No obstante, existen todavía pocos ejemplos en eucariontes, donde estas secuencias polimórficas localizadas en los extremos 3' UTR, ejerzan un efecto de control sobre la transcripción de un marco de lectura abierto (Jobse *et al.* 1995).

Recientemente, utilizando la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 Bcg<sup>+</sup>, se implementó un modelo *in vitro* para medir la expresión de los dos distintos alelos del gen *Nramp1*, previamente asociados a la resistencia y susceptibilidad a la brucelosis bovina (Adams y Templeton 1998, Horin *et al.* 1999). Mediante este sistema, empleando un gen reportero, se demostró la funcionalidad del polimorfismo localizado en el extremo 3' UTR de este gen (identificado en el presente trabajo como 311-322), ya que afectó notablemente la expresión del gen reportero, así como también, el control de la replicación de *Brucella abortus* en los macrófagos transfectados (Barthel *et al.* 2001). De manera que, en estudios posteriores, los alelos identificados en el presente trabajo, pueden constituir una herramienta útil, que contribuya a establecer una asociación más precisa de este gen con la tuberculosis o con otras enfermedades causadas por patógenos intracelulares.

## VII CONCLUSIONES

1. Los ensayos de PCR fueron optimizados con temperaturas de alineación de 56 y 62°C para los microsatélites *Aro28* y *311-322* respectivamente.
2. Se identificaron 12 alelos para el *locus Aro28*, cuatro de ellos, no identificados en estudios anteriores y, por lo tanto, considerados como nuevos. Sus tamaños fueron de 246, 254, 280 y 288pb y estuvieron presentes en porcentajes de 1% y más.
3. Para el caso del *locus 311-322*, se encontraron 5 diferentes alelos con tamaños de 221, 223, 225, 227 y 229pb; de los cuales sólo el de 223pb había sido reportado. Estos alelos se encontraron en proporciones de 3.6% y superiores.
4. La población de estudio se encontró en equilibrio genético de Hardy-Weinberg, con excepción de los animales europeos para el *locus 311-322*.
5. El uso de marcadores genéticos moleculares permite estudiar la diversidad genética que existe entre las poblaciones de una especie, y su utilización, permitirá una mayor precisión en la selección asistida por dichos marcadores.
6. En estudios posteriores, sería interesante relacionar las secuencias de las variantes genéticas encontradas en este trabajo, siendo de gran utilidad para definir su participación en la resistencia a enfermedades contra patógenos intracelulares.

## 7.1 Perspectivas

En base a los hallazgos en este trabajo y en los hallazgos de otros estudios, puede demostrarse que los marcadores moleculares, son una herramienta auxiliar útil en la solución de algunos de los problemas más importantes en la salud agropecuaria y humana. En este caso, el uso de microsatélites es consistente con el manejo de los hatos y la manipulación genética de los mismos; esto debido a la acción combinada de varios genes y de influencias ambientales en su conjunto, que dan el aspecto multifactorial de las características cuantitativas y su polimorfismo, que determinan una variación continua.

En estudios posteriores, sería interesante analizar el efecto de los nuevos polimorfismos identificados en este trabajo de una forma similar, no solo en los casos donde se haya encontrado una asociación de este *locus* con el desarrollo de la enfermedad, como en el caso de la brucelosis, sino también en aquéllos donde la asociación no sea clara como en el caso de la tuberculosis bovina. También, es conveniente desarrollar métodos especiales de análisis para identificar por lo menos, los efectos génicos individuales en esquemas de selección y cruzamiento para un mejoramiento genético más eficiente.

## REFERENCIAS

1. Adams LG & Templeton JW (1998). Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 17(1):200-219.
2. Agranoff DD, Krishna S. (1998) Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol Microbiol. May*; 28(3):403-12.
3. Alonso MRA y Ulloa AR (1997) Hacia un proyecto nacional de investigación en genomas de animales domésticos. *Vet. Méx.*, 28(4):365-370.
4. Avraham A, Band M, Yoffe O, Shani M, Ron M. (1993) Bovine dinucleotide repeat polymorphism at the Aro28 locus. *Animal Genetics Apr*; 24(2):147.
5. Barthel R, Feng J, Piedrahita JA, Mc Murray DN, Templeton JW, Adams LG. (2001) Stable transfection of the bovine NRAMP1 gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. *Infect Immun May*; 69(5):3110-9.
6. Barton H, White JK, Roach TIA and Blackwell JM (1994) NH2- terminal sequence of macrophage- expressed natural resistance- associated macrophage protein (Nramp) encodes a proline/ serine- rich putative Src homology 3- binding domain. *J. Exp. Med.* 179: 1683- 1687.
7. Blackwell JM, Barton CH, White JA, Roach TIA, Shaw MA, Whitehead SH, Mock BA, Searle S, Williams H y Baker AM (1994) Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: the Lsh/ lty/ Bcg gene story continues. *Immunol. Lett.* 43: 99- 107.
8. Camus E, Maillard JC, Ruff G, Pepin L, Naves M, Matheron G. (1996) Genetic resistance of Creole goats to coudriosis in Guadeloupe. Status in 1995. *Ann N Y Acad Sci.* Jul 23;791:46-53.
9. Doisk JK, Barton CH, Holiday DL, Krall MM, Blackwell JM and Mock BA (1994) Ab Nramp-related sequence maps to mouse chromosome 17. *Mamm. Genome.* 5: 458- 460.
10. FAO (1988) Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plan. Measurement of domestic animal diversity (MoDAD); Reporte de trabajo. Disponible en : <http://www.dad.fao.org>. Con acceso el 15 de diciembre de 2000.
11. Feng J, Li Y, Hashad M, Schurr E, Gros P, Adams LG and Templeton JW (1996) Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. *Genom. Res.* 6: 956- 964.
12. Giovambattista G, Ripoli MV, Peral-García P, Bouzat JL. (2001) Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. *Anim Genet.* Oct;32(5):240-7
13. Goldstein, D.B. and Schlötterer, C. (1999) *Microsatellites: Evolution and applications.* Oxford University Press, NY, USA.
14. Gros F, Skamene E and Forget A (1981). Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J. Immunol.* 127:2417- 2421.
15. Gruenheid S, Cellier M, Vidal S and Gros P (1995) Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genom.* 25: 514- 525.
16. Horin P, Rychlick I, Templeton J W & Adams LG (1999) A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine NRAMP1 gene. *European Journal of Immunogenetics* 26:311-313.
17. Horin P (1998) Biological principles of heredity of and resistance to disease. *Rev Sci Tech Apr*; 17(1):302-14
18. Hospital F, Charcosset A (1997) Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics* 147(3):1469-1485.
19. Jabado N, Jankowski A, Dougaparsad S, Picard V, Grinstein S, Gros P (2000) NATURAL RESISTANCE TO INTRACELLULAR INFECTIONS. Natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a ph-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med.* 192(9):1237-1248
20. Jessberger R, Podust V, Hubscher U, Berg P. (1993) A mammalian protein complex that repairs double-strand breaks and deletions by recombination. *J Biol Chem.* Jul 15;268(20):15070-9.
21. Jobse C, Bunjer JB, Haagsma N, Breukelman HJ, Beintema JJ, Lenstra JA. (1995) Evolution and recombination of bovine DNA repeats. *J Mol Evol. Sep*; 41(3):277-83.

22. Kessing B, Croom H, Martin A, McIntosh C, McMillan WO & Palumbi S (1989) The simple Fool's guide to PCR. Department of Zoology University of Hawaii. Honolulu, HI.
23. Lemus-Flores C, Ulloa-Arvizu R, Ramos-Kuri M, Estrada FJ, Alonso RA. (2001) Genetic analysis of Mexican hairless pig populations. *J Anim Sci. Dec;79(12):3021-6.*
24. Lewin, B. (2000) GENES VII Oxford Press
25. Lopez-Corrales NL, Sonstegard TS, Smith TP. Comparative gene mapping: cytogenetic localization of PROC, EN1, ALPI, TNP1, and IL1B in cattle and sheep reveals a conserved rearrangement relative to the human genome. *Cytogenet Cell Genet.* 1998;83(1-2):35-8.
26. Malo D, Vogan K, Vidal S, Hu J, Cellier M, Schurr E, Fuks A, Bumstead N, Morgan K and Gros P (1994) Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predicted susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genom.* 23: 51- 61.
27. Mathieu F.M, Cellier, Isabelle Bergevin, Elise Boyer and Etienne Richer (2001) Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters TRENDS in Genetics Vol.17 No.7 July p 365-370.
28. Mitchison, N. A. (2000) Opinion. Polymorphism in regulatory gene sequences <http://genomebiology.com/2000/2/11/comment/2001>.
29. National Human Genome Research Institute. National Institutes of Health. (2001). [www.nhgri.nih.gov/educationkit](http://www.nhgri.nih.gov/educationkit). Con acceso el 21 de marzo de 2002.
30. Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollok JA, Clements A, Walton E and Bryson DG (1994) Detection of Mycobacterium bovis in skin negative cattle with an assay for interferon-gamma. *Vet. Rec.* 135:134-135.
31. Neill SD, Hanna J, O'Brien JJ, McCracken RM (1988) Excretion of Mycobacterium bovis by experimentally infected cattle. *Vet Rec.* 123(13):340-3.
32. Ramel C (1997) Mini- and Microsatellites. *Environmental Health Perspectives.* 105(4):781-787.
33. Rincon G, D'Angelo M, Gagliardi R, Kelly L, Llambi S, Postiglioni A. (2000) Genomic polymorphism in Uruguayan Creole cattle using RAPD and microsatellite markers. *Res Vet Sci Oct;69(2):171-4*
34. Rocha, J L y Barata, G N (1997) Marcadores moleculares ao nivel da cadeia da ADN: suas aplicações no melhoramento genético animal. Tipos de marcadores moleculares. *Rev Soc Port. Ciências Vet.* Vol. XCII. 522:82-90
35. Rocha, J L y Barata, G N (1997) Marcadores moleculares ao nivel da cadeia da ADN: suas aplicações no melhoramento genético animal. Estratégias para detecção de locus quantitativos. *Rev Soc Port. Ciências Vet.* Vol. XCII. 523:130-137
36. Skamene E, Gros P, Forget A, Kongshavn PAL, Charles CSt and Taylors AB (1982). Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature.* 297: 506- 509.
37. Söller M, Andersson L (1998) Genomic approaches to the improvement of disease resistance in farm animals. *Rev Sci Tech* 17(1):329-345.
38. Supek F, Supekova L and Nelson H (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5105- 10.
39. Templeton, J. W., Smith III, R & Adams, L. G. (1988). Natural disease resistance in domestic animals. *Journal A Veterinary Medicine A,* 92(9):1306-1315.
40. Uffo R O, Sanz F A y Martinez M S (2000) Marcadores moleculares en el mejoramiento y la genética animal. EDICENSA, La Habana, Cuba.
41. Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E and Gros F (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg. *Cell.* 73: 469- 485.
42. Westermeyer R (1997) Electrophoresis in practice. 2<sup>nd</sup> edition. Verlagsgesellschaft mbH editors. Federal Republic of Germany.
43. Williams, J. L., Usha, A. P., Urquhart, B. G. D. & Kilroy, M.(1997). Verification of the identity of bovine semen using DNA microsatellite markers. *The Veterinary Record* 140:446-449.

# **A P E N D I C E S**

## APENDICE 1

### EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE SEMEN

1. Vaciar el contenido de cada pajilla en un tubo de 15 ml. Agregar 10 ml de buffer de lavado (NaCl 150mM, EDTA 10mM, pH 8.0, mezclar y centrifugar 20' a 4000 rpm.
2. Retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 1 ml de buffer de lavado en un tubo de 1.5 ml. Centrifugar durante dos minutos a 14000 rpm.
3. Retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 500  $\mu$ l de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM, NaCl 500 mM, EDTA 10 Mm, SDS 1% y agregar al momento  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final de 2%).
4. Agregar 20  $\mu$ l de proteinasa K (20  $\mu$ g/ml), mezclar e incubar durante dos horas a 60° C.
5. Agregar 20  $\mu$ l más de proteinasa K y continuar la incubación por dos horas más.
6. Se agregan 100  $\mu$ l de NaCl 5M
7. Agregar 100  $\mu$ l de CTAB-NaCl a 65°C (4.1 g NaCl/ 10g de CTAB. 100 ml de agua destilada) y calentar 10 minutos más a 65° C.
8. El DNA es extraído 1 vez con fenol/cloroformo (50:50 v/v) y 1 vez con cloroformo. Precipitar con dos volúmenes de etanol absoluto. Lavar la pastilla con 1.0 ml de etanol al 75%.
9. La pastilla de DNA es secada y disuelta en 50  $\mu$ l de Agua bidestilada estéril. Dejar en refrigeración 1 día para resuspender.
10. Evaluar la calidad del ADN obtenido en geles de agarosa al 1% y Cuantificar por fluorometría.

## APENDICE 2

### EXTRACCION DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE

1. Tomar de los viales con las muestras, 500  $\mu$ l de sangre y transferirlos a tubos de 1.5 ml. Agregar 1ml de agua bidestilada, vortexear y centrifugar a 14 000 rpm durante 10 min.
2. Tirar el sobrenadante y agregar a la pastilla 1ml de agua bidestilada, vortexear y centrifugar a 12 000 rpm por 10 min. Repetir este paso.
3. Tirar el sobrenadante y agregar 500  $\mu$ l de solución de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8; 400 mM NaCl; 20 mM EDTA pH 8; 0.5% SDS) resuspendiendo bien. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
4. Se agrega ARNasa a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml, se mezcla y se incuba a 37° C durante 1 hr. Posteriormente, agregar Proteinasa K a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml, mezclar e incubar a 55° C por una hora y a 60° C por una hora más.
5. Al terminar la incubación, se agrega NaCl a una concentración final de 2M, agitar suavemente durante 12 seg y centrifugar a 10 000 rpm por 7 min.
6. Se recupera el sobrenadante y agregar 1 volumen de isopropanol o en su caso 2 volúmenes de etanol, centrifugar 5 minutos a 14 000 rpm. Lavar la pastilla con 1ml de etanol al 70%.
7. Se deja secar la pastilla y se eluye en 50 a 100 $\mu$ l de agua bidestilada estéril. Dejar en refrigeración durante toda la noche.
8. Cuantificar por fluorometría y evaluar la calidad del ADN obtenido en geles de agarosa al 1%.

## APENDICE 3

### ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CTAB	Cetiltrimetilamonio
DNasa	Desoxirribonucleasa
EDTA	Tetra-acetato de etilendiamino
Kb	Kilopares de bases
M	Molar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
mM	Milimolar
µM	Micromolar
Ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
Rnasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Tris	Hidroximetilaminometano
U	Unidades

COPIES THIS IS NO SALE  
INFORMATION

## APENDICE 4

### GLOSARIO

**ADN Satélite.** Cualquier fracción de ADN de una especie eucariótica que difiere lo suficiente en su composición de bases de otros fragmentos de ADN debido a su alto índice de repetitividad.

**Alelo.** Serie de posibles formas alternativas de un gen dado, que se diferencia en una secuencia de ADN y que afecta la función de un producto simple (ARN o proteína). Presentación de determinada característica en sus diferentes formas. Si más de dos alelos han sido identificados en una población, se dice que existe alelismo múltiple.

**Amplificación.** Se refiere a la producción de copias adicionales de una secuencia cromosómica de ADN.

**Biología molecular.** Rama de la biología que estudia la naturaleza química (molecular) del material genético: genes y sus productos (proteínas).

**Código Genético.** Reglas de correspondencia entre la secuencia de bases del ADN y la secuencia de aminoácidos de una proteína. La lectura de 3 bases de ADN constituye una secuencia de un codón que corresponde a un aminoácido determinado.

**Cromosoma.** Unidad genética constituida por una molécula de ADN. Su tamaño y número varía dependiendo de la especie. En los eucariotes están condensados y se hacen visibles en determinadas etapas de la división celular.

**Crossing over (crossover).** El intercambio de material genético entre cromosomas homólogos.

**Exón.** Porción de un gen que corresponde a secuencias de ADN que pueden ser transcritas a ARNm y que codifican para algún producto o función celular.

**Gene pool.** Es la información genética total poseída por los miembros reproductivos de una población de organismos reproductores de forma sexual.

**Genética molecular.** Rama de la biología que se encarga del estudio de los procesos bioquímicos y genéticos a nivel del ADN, así como a la identificación de genes inscritos en la molécula de ADN.

**Genoma.** Término utilizado para referirse a los genes que conforman la totalidad de la información genética o código genético en un determinado organismo.

**Haplotipo.** Es la combinación particular de alelos en una región definida de un cromosoma.

**Heterocigoto.** Individuo en el cual los dos genes de un *locus* genético presentan diferentes alelos

**Homocigoto.** Individuo que presenta alelos iguales en un *locus* genético.

**Intrón.** Segmento de un gen en organismos superiores, que no codifica, interrumpiendo la secuencia de las bases que sí codifican y que se remueve en el proceso posterior a la transcripción.

**Manipulación genómica.** Formación de nuevas combinaciones de genes *in vitro*, mediante la unión de fragmentos de ADN de interés a vectores, permitiendo su incorporación dentro de un organismo hospedador donde puedan ser propagados.

**Mapeo genómico.** Asignación de un *locus* a un cromosoma específico y determinación de la secuencia de genes y sus distancias relativas de uno a otro en un cromosoma específico.

**Marcador.** Gen con una ubicación conocida en el cromosoma y un genotipo claramente distinguible; utilizado como punto de referencia al mapear una mutante nueva. También existen marcadores antigénicos que sirven para distinguir tipos celulares. Otros son los marcadores de ADNs, ARNs y proteínas, que son fragmentos de tamaños o propiedades conocidos, empleados en la calibración de geles electroforéticos.

**Marcador genético.** Es un gen cuya expresión fenotípica es comúnmente de fácil distinción, es utilizado para identificar a un individuo o una célula que lo porta, tal como las sondas marcadoras del núcleo, cromosomas o *locus*.

**Mutación** Proceso mediante el cual un gen sufre un cambio estructural en la secuencia de sus bases. La mutación génica es un fenómeno aleatorio

cuyas consecuencias son difícilmente generalizables por tantos eventos implicados que ocurren en ellas. Existen diferentes tipos de mutaciones: las que pueden revertir que se denominan PUNTUALES (aquéllas donde se modifica una sola base), son espontáneas y se presentan en una tasa baja de aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  eventos por *locus* por generación. Dentro de estas mutaciones puntuales existen las mutaciones por TRANSICIÓN que consisten en el cambio de una purina por otra purina (A→T o T→A) o de una pirimidina por otra pirimidina (G→C o C→G) y las mutaciones llamadas por TRANSVERSION donde se cambia una purina por una pirimidina (A o T→G o C) o una pirimidina por una purina (C o G→T o A). Las mutaciones DE SEGMENTO DE MOLECULA, donde se modifican 2 o más bases. También existen las mutaciones que por lo general no revierten: por INSERCIÓN donde el número de bases se ve incrementado en número que puede ir de 1 hasta una secuencia de kilobases; las ocasionadas por DELECIÓN donde las bases se ven disminuidas desde 1 hasta varios cientos de bases. Ambas pueden llevar a ocasionar aberraciones cromosómicas por la pérdida de secuencia, y por lo tanto, modificación en el fenotipo por cambio en la síntesis protéica. Pueden observarse mutaciones SILENCIOSAS: donde no se observa cambio fenotípicamente, pero genotípicamente se tienen 2 mutaciones donde la segunda suprime o revierte a la primera.

**Oligonucleótidos (Oligos, iniciadores o primers).** Segmentos sintéticos de ADN complementarios a los sitios de inicio de la síntesis de ADN, donde la enzima ADNpolimerasa reconoce estos sitios para empezar la duplicación. Estos son diseñados para ser ubicados en las regiones que flanquean el segmento que se desea amplificar.

**PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).** Técnica utilizada para la amplificación de ADN en el laboratorio utilizando la enzima ADNpolimerasa, que es una macromolécula que cataliza la formación y reparación de ADN. Consiste de un proceso bioquímico en el cual un segmento específico de ADN es amplificado mediante ciclos sucesivos de síntesis (20 o 30) que integran la reacción; cada ciclo de replicación consiste de tres fases: Desnaturalización, Alineamiento y Extensión. Al término de cada uno de ellos, las cadenas formadas, son nuevamente duplicadas, con lo que se obtiene un número exponencial de copias del gen o segmento específico de ADN. La PCR es utilizada en una gran variedad de áreas, pero ha tenido un impacto principal en investigaciones en biología molecular, en el proyecto del Genoma Humano y en el diagnóstico de enfermedades.

**Pleiotrópico.** Gen que tiene distintos efectos. Una mutación determinada puede alterar severamente el organismo o tener ligero efecto, solo detectable cuando se asocia a otros genes a través de una acción acumulativa.

**Polimorfismo.** El polimorfismo genético puede definirse como la ocurrencia de una población de variantes discontinuas de origen genético, con una frecuencia del gen que no puede ser explicado por la acción exclusiva de la mutación recurrente, por ser este un evento sumamente raro. También se puede hablar de polimorfismo genético si por lo general genotipos heterocigotos en numerosos *loci* son superiores a cualquier genotipo homocigoto. Se conocen tres tipos de polimorfismo genético: a) Polimorfismo visual o morfológico, es aquel referido a las variantes genéticas que se observan y afectan la morfología del individuo, por ejemplo la presencia o ausencia de caracteres. Es fácil de observar y cuantificar, pero la mayoría son dominantes, no permiten diferenciar individuos homocigotos dominantes de heterocigotos y no existe relación directa y cercana entre el fenotipo observado y el genotipo. Polimorfismo cromosómico, son cambios en juegos completos de genes (cromosomas) ya sea de carácter numérico (ploidías, aneuploidías o poliploidías) o estructurales (traslocación, delección, inserción o inversión de segmentos cromosómicos). Tiene como desventaja que se estudian bloques de genes completos, no se obtiene información exacta de un gen específico. Polimorfismo bioquímico, se trata de diferentes tipos de una misma molécula que determinan diferentes alelos; estas difieren en su composición de aminoácidos en el caso de las proteínas, o de nucleótidos cuando se trata de ADN.

**QTL.** Región conocida en un cromosoma identificado como un *locus* con efectos cuantitativos sin que se conozca su ubicación precisa en el gen, pero sí en el cromosoma.

**Recombinación.** Ocurrencia de la combinación de genes que ocurren en la prole debido a crossover o a segregación independiente.

**Slippage.** Error que ocurre comúnmente durante la duplicación del ADN, en el cual, la polimerasa agrega bases de más o de menos y que puede conducir a mutación.

**Traducción.** Proceso por el cual se lee la secuencia de codones del ARN y se elabora una cadena de proteína con la secuencia correspondiente de acuerdo con el código genético.

**Transcripción.** Proceso por el que un gen se expresa mediante la síntesis de ARN que contiene la misma secuencia del gen.

**Unidad Morgan.** Es la unidad que sirve para expresar la distancia relativa entre genes en un cromosoma. Un Morgan (M) equivale a un valor "crossover" (recombinación) de 100%. Un valor crossover de 10% es un deciMorgan (dM) y 1% es un centiMorgan (cM).

## APENDICE 5

### PERCENTILES DE LA DISTRIBUCIÓN ji-CUADRADA

g.l.	$\chi^2_{.995}$	$\chi^2_{.975}$	$\chi^2_{.95}$	$\chi^2_{.90}$	$\chi^2_{.85}$	$\chi^2_{.80}$	$\chi^2_{.75}$	$\chi^2_{.70}$
1	.0000393	.000982	.00393	2.706	3.841	5.024	6.635	7.879
2	.0100	.0506	.103	4.605	5.991	7.378	9.210	10.597
3	.0717	.216	.352	6.251	7.815	9.348	11.345	12.838
4	.207	.484	.711	7.779	9.488	11.143	13.277	14.860
5	.412	.831	1.145	9.236	11.070	12.832	15.086	16.750
6	.676	1.237	1.635	10.645	12.592	14.449	16.812	18.548
7	.989	1.690	2.167	12.017	14.067	16.013	18.475	20.278
8	1.344	2.180	2.733	13.362	15.507	17.535	20.090	21.955
9	1.735	2.700	3.325	14.684	16.919	19.023	21.666	23.589
10	2.156	3.247	3.940	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188