

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
EXTENSIÓN SANTO DOMINGO DE LOS COLORADOS**

**IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LA KAPPA-CASEÍNA (κ -CN) POR
TÉCNICAS MOLECULARES (PCR-RFLP), EN UN HATO LECHERO
DEL TRÓPICO ECUATORIANO. BASE PARA LA SELECCIÓN
ASISTIDA.**

AUTORES:

**CARLOS ROBERTO TERÁN POLO
ALFREDO PATRICIO SANTILLÁN LATORRE**

INFROME TÉCNICO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

SANTO DOMINGO DE LOS COLORADOS - ECUADOR

Noviembre – 2006

“IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LA KAPPA-CASEÍNA, POR
TÉCNICAS MOLECULARES (PCR-RFLP), EN UN HATO LECHERO
DEL TRÓPICO ECUATORIANO. BASE PARA LA SELECCIÓN
ASISTIDA”.

AUTORES:

CARLOS ROBERTO TERÁN POLO
ALFREDO PATRICIO SANTILLÁN LATORRE

REVISADO Y APROBADO

MAYO. ESP. ING. RENE GONZALEZ.
COORDINADOR DE CARRERA

Ing. Marcelo Cevallos, Ph. D DIRECTOR	Ing. Manuel Fuentes CODIRECTOR
Ing. Gabriel Suárez BIOMETRISTA	

CERTIFICO QUE ESTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN ORIGINAL (EN MEDIO
MAGNÉTICO) E IMPRESO EN DOS EJEMPLARES.

Ab. Mónica Bonilla

UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

“IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LA KAPPA-CASEÍNA, POR
TÉCNICAS MOLECULARES (PCR-RFLP), EN UN HATO
LECHERO DEL TRÓPICO ECUATORIANO. BASE PARA LA
SELECCIÓN ASISTIDA”.

AUTORES:

CARLOS ROBERTO TERÁN POLO
ALFREDO PATRICIO SANTILLÁN LATORRE

APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN
DEL INFORME TÉCNICO.

	CALIFICACIÓN	FECHA
Ing. Marcelo Cevallos, Ph.D DIRECTOR	_____	_____
Ing. Manuel Fuentes CODIRECTOR	_____	_____

CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN ESTA
SECRETARÍA.

Ab. Mónica Bonilla
UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

DEDICATORIA

A Dios, mentalizador de mi esencia, mi fuerza, mi naturaleza y mi espíritu.

A mis padres, Carlos y Gladys, por todo su amor y comprensión.

A mis hermanas Mónica y Kathy y mi sobrino Mateo, por ser la fuente de impulso, empuje y superación.

A mi esposa Isabel y mi hija Camilie, por ser la esencia de mi vida.

A todos mis familiares y personas, por su voto de fe y confianza.

Alfredo.

A Dios, gestor de mi voluntad

A mis Padres Roberto y Alicia, por que en su seno encontré ternura y amor.

A mis Tías Beatriz y Teresa, por su inmenso amor y apoyo, desde el cielo son mis ángeles de la guarda.

A mi Esposa Jesy, mi hijo Roberto Israel, por creer y ser mi razón de vivir.

A mis hermanos Byron y Aly, por permitirme a crecer juntos.

A mi tío Marco Tulio, ejemplo de superación.

Carlos Roberto

AGRADECIMIENTOS

A Dios todo poderoso, por bendecirnos y guiarnos a lo largo de nuestras vidas.

A la Escuela Politécnica del Ejército, especialmente a la Carrera de Ciencias Agropecuarias, gestora de nuestros conocimientos y triunfos en nuestra vida profesional, así mismo por ser la Institución donde hemos conocido a compañeros leales y sinceros.

A la Carrera de Biotecnología, por el apoyo y la confianza; gracias por habernos permitido ser parte de Ustedes, nuestro mayor logro en este tiempo es haber compartido con personas valiosas en principios y valores.

A la Hda. ESPE-San Antonio, por permitirnos desarrollar este proyecto de investigación, tanto en su financiamiento como en su ejecución.

A nuestro Director, Dr. Marcelo Cevallos y Codirector, Ing. Manuel Fuentes; por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A nuestra coordinadora, Dra. Karina Proaño, por todo el tiempo que nos ha dedicado, por sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho hemos sacado, por su respaldo y amistad.

A la Dra. Odalys Uffo, por enseñarnos que no hay límites, que lo que nos proponemos lo podemos lograr y que solo depende de nosotros; por su participación activa en el proyecto con todos sus conocimientos en el área de la biología molecular.

Al Sr. Crnl. Ing. Patricio Jaramillo y Familia, por haber confiado y creído en nuestro proyecto, por su apoyo incondicional y permitirnos la feliz consecución del mismo.

Al Biometrista, Ing Gabriel Suárez por su orientación en el análisis estadístico de los datos.

A la Dra. Patricia Jiménez y Dr. Marcelo Grijalva; por sus enseñanzas en las técnicas empleadas para el desarrollo del Proyecto.

A todas las personas que de una o de otra manera nos apoyaron para cumplir nuestro objetivo.

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios, por el milagro de la vida y la plenitud de mis acciones; para seguir creciendo: emocional, inteligente y espiritualmente.

A mis padres: Carlos y Gladys, por ser los gestores del calor de hogar donde me han inculcado un cúmulo de principios y valores con los que pienso edificar toda mi vida.

A mis hermanas: Mónica y Kathy, por ser mis compañeras, mis confidentes y mis más sinceras amigas, por todo su amor y comprensión. A mi sobrino Mateo, por iluminar mi vida siendo una luz motivadora para luchar por mis ideales.

A mi esposa Isabel, mi hija Camilie, la fuente de motivación, de inspiración y de lucha, para seguir atesorando nuevas experiencias y aciertos en nuestras vidas.

A mis familiares y todas las personas que han aportado con su grano de arena para seguir luchando y creciendo en esta hermosa vida.

A mi compañero de tesis Roberto, por toda su entrega, confianza y apoyo. Gracias por tus valiosas enseñanzas, por esos momentos compartidos y por tu amistad sincera.

Alfredo.

A mi Dios, luz y enseñanza en mi vida.

A mis Padres, Roberto y Alicia, por ser el paraíso en mis momentos de tormenta y con su inmenso amor y firmeza moldearon mi espíritu, como hijo y padre.

A mis tías, Beatriz y Teresa, por el amor, apoyo, ternura; por ser todo para mi espíritu. El refugio de paz, el ejemplo de vida de honestidad y sacrificio.

A mis Hermanos, Byron y Aly, por darme el aliento necesario en tiempos difíciles y pasar momentos felices en mi vida, seguimos teniendo la ternura de la niñez en la que crecimos.

A mi esposa Jesy y mi hijo Roberto Israel, por su comprensión, paciencia y ternura, brindada cada día de mi vida, son mi fortaleza y estímulo.

A mi compañero de tesis Alfredo, por su amistad sincera y paciencia, por disfrutar todo el tiempo de su calidad de persona.

A todas las personas que de una o de otra manera me apoyaron para cumplir mi objetivo.

C. Roberto.

INDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	
OBJETIVOS	5
A. OBJETIVO GENERAL	
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
CAPÍTULO III	
HIPÓTESIS	6
CAPÍTULO IV	
REVISIÓN DE LITERATURA	7
A. GANADERIA EN EL ECUADOR	7
1. <u>Estructura de la Producción por tamaño de Unidad Productiva Agropecuaria (UPA's)</u>	7
2. <u>Niveles Tecnológicos en finca</u>	10
3. <u>Evolución de Rendimientos (litros⁻¹ vaca⁻¹ día⁻¹)</u>	10
B. BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA PRODUCCIÓN ANIMAL	
1. <u>Composición de la leche</u>	
2. <u>Proteínas lácteas</u>	11
a. Caseínas	13
b. Estructura y composición de las micelas de caseína	14
c. Estructura de los genes de las proteínas lácteas	14
d. Estructura del gen de la κ -caseína	15
e. Loci de la κ -caseína relacionado con características de producción lechera	16
3. <u>Estudios de variabilidad genética mediante el uso de Marcadores Moleculares (MM)</u>	21
4. <u>Análisis genético en Bovinos</u>	23
a. QTLs en el ganado lechero	25
	27
C. HERRAMIENTAS DE INGENIERIA GENÉTICA	
1. <u>Enzimas de Restricción</u>	29
a. Generalidades	29
b. Características	29
c. Tipos de Enzimas de Restricción	30
1) Tipo I	33
2) Tipo II	33
3) Tipo III	34
d. Nomenclatura	35

e.	Factores críticos a considerar	35
	1) Pureza del ADN	35
	2) Temperatura y pH	35
	3) ADNsas	35
	4) Contaminantes con carga (-)	36
	5) ADN contaminado con otro ADN	36
	6) Grados de metilación	36
	7) Tipo de molécula de DNA	36
	8) Buffer adecuado	36
f.	Aplicaciones de las Enzimas de Restricción.	36
2.	<u>Electroforesis de ADN</u>	37
a.	Generalidades	37
b.	Métodos electroforéticos zonales	39
	1) Electroforesis en gel de poliacrilamida.	40
	2) Electroforesis en geles de agarosa.	40
	3) Electroforesis capilar	42
3.	<u>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</u>	43
a.	Generalidades	43
b.	Desnaturalización	45
c.	Hibridación	45
d.	Extensión	46
e.	Componentes de la PCR	49
	1) Buffer de amplificación	49
	2) “Primers”	50
	3) Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs)	51
	4) Taq Polimerasa	51
	5) ADN molde o “Template”	52
	6) Adyuvantes de la PCR	53
4.	<u>RLFP’s (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción).</u>	55
a.	Generalidades	55
b.	PCR - RFLP	55

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

A.	MATERIALES	57
B.	MÉTODOS	59
1.	<u>Animales</u>	59
2.	<u>Obtención del material genético</u>	61
a.	Extracción de ADN partiendo de sangre periférica	62
	1) Protocolo de Osta (1994) citado por Uffo (2000).	62
	2) Protocolo de Uffo (2000). Modificado en este estudio.	63
	3) Protocolo Extracción Kit Wizard Promega.	67
3.	<u>Preparación de geles de agarosa</u>	70
4.	<u>Cuantificación de ADN</u>	76
5.	<u>Selección de los cebadores (primers)</u>	79
6.	<u>Amplificación por PCR del gen de la kappa-caseína</u>	81
7.	<u>Digestión del producto amplificado, RFLP</u>	87
8.	<u>Determinación de las variantes alélicas</u>	88

9. <u>Determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas.</u>	89
CAPÍTULO VI	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
A. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN PARTIENDO DE SANGRE PERIFÉRICA	90
B. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN DE LA KAPPA-CASEÍNA	93
1. <u>Selección de los cebadores (primers)</u>	93
2. <u>Optimización de la PCR</u>	95
3. <u>Etapas de la PCR</u>	97
C. DIGESTION DEL PRODUCTO AMPLIFICADO	98
D. DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS.	103
1. <u>Análisis general de la Muestra</u>	103
2. <u>Análisis de la Muestra correspondiente de la raza Brahaman.</u>	109
3. <u>Análisis de la Muestra correspondiente a reproductores dentro del hato lechero</u>	110
4. <u>Análisis de hembras productoras de leche</u>	111
a. Análisis de las frecuencias genotípicas	113
b. Análisis de la producción de leche	116
c. Regresión genotipo-producción de leche	118
CAPÍTULO VII	
CONCLUSIONES	122
CAPÍTULO VIII	
RECOMENDACIONES	124
CAPÍTULO IX	
RESUMEN	126
CAPÍTULO X	
SUMMARY	128
CAPÍTULO XI	
GLOSARIO	130
CAPÍTULO XII	
BIBLIOGRAFIA	135
ANEXOS	

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 4.1. Composición general de la leche.	12
Tabla 4.2. La composición de la leche en diferentes razas de bovinos	13
Tabla 4.3. Diferencias aminoacídicas entre las variantes de la κ -caseína bovina.	20
Tabla 4.4. Algunas endonucleasas de restricción y sus orígenes	33
Tabla 5.1. Concentración de ADN por comparación de intensidad del Marcador Low DNA ¹ .	77
Tabla 6.1. Relación entre intensidad de las bandas de las muestras, con la intensidad de las bandas del Marcador Low DNA Mass Ladder, para determinar la concentración de ADN.	90
Tabla 6.2. Relación entre intensidad de las bandas de ADN las muestras utilizando el Kit Wizard Promega, con la intensidad de las bandas del Marcador Low DNA Mass Ladder, para determinar la concentración de ADN.	92

¹ Origen: Invitrogen®, Low DNA Mass Ladder. Cat. No. 10068-013

LISTADO DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 4.1. Comparación de los tipos de enzimas de restricción.	34
Cuadro 5.1. Cebadores utilizados para la amplificación de la región estudiada del gen de la κ -caseína.	80
Cuadro 5.2. Componentes de la Master Mix para la reacción de la PCR.	83
Cuadro 5.3. Enzima de restricción para el fragmento del gen amplificado.	87
Cuadro 6.1. Comparación de las T_m , de cada juego de primers	94
Cuadro 6.2. Tabla con valores binarios (0-1) para determinar el genotipo de las Unidades de Muestreo (UM).	104
Cuadro 6.3. Resultado global de los genotipos encontrados en animales de la Hda. ESPE “San Antonio”.	105
Cuadro 6.4. Cálculo para determinar la frecuencia genotípica observada de las UM seleccionadas.	106
Cuadro 6.5. Cálculo para determinar la frecuencia alélica de las UM seleccionadas.	106
Cuadro 6.6. Cálculo para determinar la frecuencia genotípica esperada de las UM seleccionadas.	106
Cuadro 6.7. Cálculo de χ^2 (Chi cuadrado), para las UM seleccionadas.	107
Cuadro 6.8. Frecuencias genotípicas y alélicas observados y esperadas en las UM seleccionadas de la Hacienda ESPE “San Antonio”, bajo condición de equilibrio genético de Hardy -Weinberg.	108
Cuadro 6.9. Frecuencias alélicas de κ -caseína de razas de bovinos.	109
Cuadro 6.10. UM de la raza Brahaman de la Hda. ESPE “San Antonio”.	110
Cuadro 6.11. Reproductores del hato de leche de la Hda. ESPE “San Antonio”.	110
Cuadro 6.12. Producción de las Unidades de Muestreo (UM) del hato de leche de la Hda. ESPE “San Antonio”.	112
Cuadro 6.13. Resultado de los genotipos encontrados en la UM en producción.	114
Cuadro 6.14. Cálculo para determinar la frecuencia genotípica observada de las UM en producción.	114
Cuadro 6.15. Cálculo para determinar la frecuencia alélica de las UM en producción.	114
Cuadro 6.16. Cálculo para determinar la frecuencia genotípica esperada de las UM en producción.	115
Cuadro 6.17. Cálculo de χ^2 (Chi cuadrado), para las UM en producción.	115
Cuadro 6.18. Frecuencias genotípicas y alélicas observados y esperadas en las U.M en producción de la Hacienda ESPE “San Antonio” bajo condición de equilibrio genético de Hardy-Weinberg.	116
Cuadro 6.19. Análisis de Varianza de la U.M en producción.	116
Cuadro 6.20. Producción de leche ajustada a los 305 días para cada uno de los genotipos encontrados DMS al 5%.	117
Cuadro 6.21. Análisis de varianza de la regresión genotipos-producción.	119
Cuadro 6.22. Ecuación de regresión, coeficientes de correlación y determinación.	119
Cuadro 6.23. Coeficientes de Correlación y Determinación.	120

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 4.1. Estructura primaria del gen κ -caseína B-1P (<i>Bos taurus</i>) y de la variante genética A.	17
Figura 4.2. Secuencia del exón IV y el polimorfismo en el gen de la κ -caseína	18
Figura 4.3. Las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción	31
Figura 4.4. Unión entre fragmentos de ADN con extremos adhesivos o pegajosos, con la enzima de restricción <i>EcoRI</i>	32
Figura 4.5. Molde del gel de agarosa	42
Figura 4.6. Partiendo de una cadena original de ADN, se obtiene nuevas cadenas complementarias.	44
Figura 4.7. Desnaturalización de la cadena de ADN.	45
Figura 4.8. Hibridación de los cebadores	46
Figura 4.9. Extensión con Taq polimerasa.	47
Figura 4.10. Proceso completo de amplificación de ADN.	48
Figura 4.11. Migración en gel de los pares de bases de una molécula de ADN amplificada.	49
Figura 5.1. En 1 y 2 se observa el sobrenadante claro quedando los leucocitos (glóbulos blancos) en el pellet.	65
Figura 5.2. Intensidad del Marcador Low Mass Ladder (Invitrogen®), en cantidades de 4 μ l y 8 μ l, con el tamaño de fragmentos correspondiente.	77
Figura 5.3. Ilustración del gen de la κ -caseína y ubicación de los cebadores.	81
Figura 5.4. Preparación de la solución madre “Master Mix” para PCR.	82
Figura 5.5. Preparación de controles positivos y negativos en la PCR.	83
Figura 5.6. Primera etapa. Separación del ADN (<i>melt</i>).	84
Figura 5.7. Segunda etapa. Hibridación de la cadena de ADN.	85
Figura 5.8. Tercera Etapa. Alargamiento de la Cadena de ADN.	85
Figura 5.9. Proceso concluido de la PCR.	86
Figura 6.1. Intensidad de bandas de ADN bovino. Menor intensidad corresponden a la metodología Uffo (2000); y de mayor intensidad, corresponden a la metodología Uffo (2000) modificado en esta investigación.	91
Figura 6.2. Intensidad de bandas de ADN bovino, obtenidas por 3 metodologías distintas.	92
Figura 6.3. Visualización de la intensidad de las bandas de ADN bovino, obtenidas utilizando el Kit Wizard Promega.	93
Figura 6.4. Evaluación de la reconstitución de los “primer” CASK a 75 pmol y su visualización en gel de agarosa.	94
Figura 6.5. Fragmento no amplificado del gen de la κ -caseína en los ensayos de optimización de la PCR.	95
Figura 6.6. Fragmentos amplificados del gen de la κ -caseína bovina, correspondiente a 437 pb.	98
Figura 6.8. Visualización de la banda de 437 pb, correspondiente a la variante alélica AA, luego del corte con la enzima de restricción <i>HindIII</i> durante 3h de incubación. Gel de agarosa al 3 %, condiciones de electroforesis 120 V, en 1h.	100
Figura 6.9. Colores invertidos de la Figura 6.8	100
Figura 6.10. Visualización de la banda de 437 pb y 347 pb, correspondiente a la variante alélica AB, luego del corte con la enzima de restricción <i>HindIII</i> durante 3h de incubación. Gel de agarosa al 3 %, condiciones de electroforesis 120 V, en 1h.	101

Figura 6.11. Colores invertidos de la Figura 6.10.	101
Figura 6.12. Visualización de las bandas de: 437, 347 y 90 pb; para los genotipos AA, AB y BB respectivamente. Gel de agarosa al 3 %, condiciones de electroforesis 120 V, en 1h.	102
Figura 6.13. Colores invertidos de la Figura 6.12	102

LISTADO DE FOTOS

	Pág.
Foto 5.1. Actividad de campo para la selección de las Unidades de Muestreo en la Hacienda ESPE “San Antonio”.	60
Foto 5.2. Animal seleccionado para el proyecto de investigación.	60
Foto 5.3. Extracción de sangre de la vena caudal bovina.	61
Foto 5.4. Las muestras son colocadas en recipientes para mantenerlas en frío.	62
Foto 5.5. Colocar 300 µl de sangre bovina en un tubo eppendorf.	64
Foto 5.6. Lavados con 1 ml de solución NE 10X.	64
Foto 5.7. Centrifugación de muestras a 13.000 rpm.	65
Foto 5.8. Digestión con solución PK2, para ruptura de leucocitos y precipitación de proteínas.	66
Foto 5.9. Incubación de las muestras a 56° C, para liberar el ADN bovino.	66
Foto 5.10. Kit Wizard Promega, para la extracción de ADN bovino.	67
Foto 5.11. Solución precipitadora de proteína, del Kit Promega.	68
Foto 5.12. Añadir Etanol al 70%, para lavar medusa de ADN.	69
Foto 5.13. Incubación de las muestras por 1 hora a 65° C, para rehidratar el ADN bovino.	69
Foto 5.14. Bandeja molde para electroforesis.	70
Foto 5.15. Agitación y calentamiento para la dilución de agarosa.	71
Foto 5.16. Aplicación de Bromuro de etidio en la dilución del gel de agarosa.	72
Foto 5.17. En 1 se escogió el peine a utilizar, en 2 se vertió la dilución de agarosa en la bandeja molde para la polimerización del gel de agarosa, después de 20 minutos.	73
Foto 5.18. Preparación de la muestra de ADN bovino.	74
Foto 5.19. Mezcla buffer juice (bromo fenol) y ADN bovino.	74
Foto 5.20. Carga de la muestra buffer y ADN bovino en el gel de agarosa.	75
Foto 5.21. Bandeja lista para la corrida electroforética.	75
Foto 5.22. Corrida electroforética a 120 V, de las UM bovinas.	76
Foto 5.23. Visualización de las muestras bajo luz UV.	76
Foto 5.24. Espectrofotómetro (UV-VIS Dual Beam, Labomed INC), para cuantificar ADN bovino.	78
Foto 5.25. Software UV-WIN, para ser utilizado con espectrofotómetro.	79
Foto 5.26. Termociclador TECHNE Progene 1999, utilizado para la amplificación del fragmento en estudio.	84
Foto 5.27. Termociclador TECHNE TC-512 2003, utilizado para la incubación de las muestras con la enzima <i>HindIII</i> .	88

LISTADO DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 4.1. Ganado bovino en el Ecuador.	8
Gráfico 4.2. Número de UPAs por tamaños y cabezas, según existencia de ganado bovino, en el Ecuador.	8
Gráfico 4.3. Formas de Reproducción de los hatos bovinos del Ecuador.	9
Gráfico 6.1. Genotipo de las Unidades de Muestreo.	105
Gráfico 6.2. Histograma de producción de leche de las UM en producción.	113
Gráfico 6.3. Rangos de producción obtenidos de los genotipos estudiados.	118
Gráfico 6.4. Regresión Genotipo-Producción.	120

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A: SECUENCIA DEL GEN DE LA KAPPA-CASEÍNA.

ANEXO B: DOCUMENTOS SOPORTE DE LA SECUENCIA DEL GEN KAPPA-CASEÍNA.

ANEXO C: RELACIÓN DE CÓDIGOS Y MARCAS DE REACTIVOS.

ANEXO D: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK.

ANEXO E: CEBADORES QUE FLANQUEAN UN FRAGMENTO DE 337 pb, EXON IV (233pb) – INTRON IV (104pb): entre los nucleótidos +5214 y +5550.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El Ecuador posee una diversidad de rebaños bovinos criollos (55%), mestizos sin registro (42%), manejados en su gran mayoría en los sectores rurales; 1'500.000 ecuatorianos están vinculados a este sector y dependen económicamente de la industria lechera, el 75% del total de la leche producida en el país proviene de pequeñas y medianas Unidades Productoras Agropecuarias (UPAs) (SICA, 2000).

El último Censo Agropecuario (2000) refleja que la ganadería en el país es manejada en una forma extensiva, de lo que se desprende que el 87% de las Unidades Productoras están muy poco tecnificadas, razón por la cual un alto porcentaje de las UPAs (74%) maneja la reproducción con monta libre y controlada, tan solo un 2% lo realizan con técnicas de inseminación artificial y transferencia de embriones. Claramente este indicador sugiere que el nivel tecnológico en el país no ha evolucionado significativamente, lo que se demuestra en los rendimientos de leche a nivel nacional que han tenido un incremento más bien modesto entre los años 1974 y 2000, ya que pasaron de 3,9 $\text{litro}^{-1} \text{ vaca}^{-1} \text{ día}^{-1}$ a 4,4 $\text{litro}^{-1} \text{ vaca}^{-1} \text{ día}^{-1}$; lo que significa un aumento de medio litro en un cuarto de siglo.

En este contexto, es urgente la generación de herramientas tecnológicas de costo razonable accesibles a los productores de este sector.

La Selección Asistida por Marcadores (SAM) emplea las estrategias de la bioquímica, la biología molecular, la genética y los registros fenotípicos, con el fin de determinar el genotipo de los individuos adultos, los fetos durante los primeros estadios de la gestación o los embriones antes de la implantación; lo cual, ofrece la posibilidad de disminuir el tiempo requerido para el cambio genético en las poblaciones de ganado en los programas de mejoramiento animal. Chile (Felmer y Butendieck, 1998); Argentina (Giovambattista *et al.*, 2001); Uruguay (Postiglioni *et al.*, 2002); Cuba (Uffo y Martínez, 2002); Perú (Veli *et al.*, 2004); USA (Rincón y Medrano, 2003) y Colombia (López y Vásquez, 2004); reportan el uso de marcadores moleculares para la identificación de genes

que codifican las proteínas lácteas de la leche y su alta correlación con datos productivos, reflejan claramente el avance en sus programas de mejoramiento genético bovino.

El objetivo de la investigación plantea la identificación del gen de la kappa caseína (proteína de la leche) y sus variantes alélicas; por medio de técnicas moleculares utilizando la metodología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction) y, en la detección de fragmentos del Ácido Desoxiribonucleico (ADN) de distinto peso molecular (por digestión con la misma enzima de restricción) llamada Polimorfismo en el Tamaño de los Fragmentos de Restricción conocida como RFLP por sus siglas en inglés (Restriction Fragment's Length Polymorphism), para optimizar los procesos de mejoramiento genético en un hato lechero del trópico ecuatoriano. Junto con ello, estandarizar metodologías de trabajo para la identificación del gen de la κ -caseína determinando la frecuencia genotípica y alélica de este gen en el hato de la Hacienda ESPE "San Antonio" y establecer las correlaciones genéticas entre las variantes moleculares encontradas y los datos de productividad reportados en los genotipos estudiados.

En los últimos años la investigación genética ha identificado numerosas secuencias de genes, así como novedosas técnicas para el estudio de variabilidad de las secuencias de ADN entre individuos y poblaciones, de este modo se abre paso a la utilización de los marcadores moleculares.

La posibilidad de detectar esas diferencias a nivel de secuencia de ADN, y que estos polimorfismos se utilicen como marcadores para desarrollar estudios en el genoma, ha cambiado significativamente la aplicación de la genética y ha permitido el desarrollo de técnicas para el diagnóstico molecular, utilizadas en animales domésticos y de importancia económica (Uffo y Martínez, 2002).

Schlimme y Buccheim (2002), reportan que la cadena peptídica de la κ -caseína está constituida por 169 aminoácidos y tiene una masa molecular de 19,007 g/mol, (19000 Da), ubicada en el exón IV del cromosoma 6 bovino. Se han descrito 10 alelos del gen κ -

caseína. Los más frecuentes son κ -CN^A y κ -CN^B, los restantes aparecen muy raras veces, y pueden diferenciarse por la sustitución de varios aminoácidos.

La base molecular del polimorfismo genético de las proteínas de la leche es la sustitución o supresión aminoacídica en la estructura primaria de la proteína, generada por cambios nucleotídicos en la secuencia de los genes que codifican para las mismas. Es por esto que para realizar estudios de polimorfismo genético en bovinos, relacionados con características productivas, se utilizan técnicas moleculares muy sensibles, capaces de detectar pequeñas variaciones en los genes, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), entre otras (Uffo y Martínez, 2002).

La combinación de estas dos técnicas permite identificar exactamente los alelos que portan los marcadores en estudio. Estas técnicas especialmente la PCR, han abierto el camino en la industria lechera para utilizar, de forma práctica los marcadores a nivel genético, como asistencia en los programas de selección (Uffo y Martínez, 2002).

La leche derivada de animales con genotipo AA tienen menor porcentaje de κ -caseína (κ -CN), y como consecuencia de esto una mayor proporción de micelas grandes. Por lo contrario, la leche de animales BB presentan mayor proporción de κ -caseína y micelas más pequeñas (mayores niveles de proteínas, grasa y sólidos totales). Esta característica explica la formación de un cuajo más firme y una mayor retención de sólidos, lo que resulta en su rendimiento superior durante la producción de quesos, comparada con la leche producida por animales con genotipo AA (Giovambattista *et al.*, 1998). El alelo A es más frecuente en la raza Holstein, Friesian, Ayrshire, Danés Rojo y Cebú Indico. La variante B, en cambio, es más frecuente en las razas Jersey, Normando y Cebú Africano (López y Vásquez, 2004).

Lo anterior plantea el reto de cambiar las proporciones genotípicas de esta característica por medio de la estandarización de las técnicas que permite la tipificación del gen de la κ -caseína, en los hatos de producción ganadera del país, y poder contar con

animales con características especiales de producción lechera tanto en calidad como en cantidad, así mismo disminuir el intervalo generacional y reducir el costo de cría; haciendo mejor uso de la variación genética no aditiva, con la finalidad que pequeños y medianos productores puedan potencializar estas características en las progenies de sus hatos para mejorar los niveles de productividad y competitividad del país.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

C. OBJETIVO GENERAL

Identificación del gen de la κ -caseína, y sus variantes alélicas; por medio de técnicas moleculares, para optimizar los procesos de mejoramiento genético en un hato lechero del trópico ecuatoriano.

D. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar metodologías de trabajo para la identificación del gen de κ -caseína determinando la frecuencia genotípica y alélica de este gen en el hato

de la Hacienda ESPE “San Antonio” mediante el uso de marcadores moleculares.

2. Establecer las correlaciones genéticas entre las variantes moleculares encontradas y los datos de productividad reportados en los genotipos estudiados.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

El uso de técnicas moleculares permitirá identificar las variantes alélicas del gen de la κ -caseína, para optimizar los programas de mejoramiento genético en un hato lechero del trópico ecuatoriano.

CAPÍTULO IV

REVISIÓN DE LITERATURA

B. GANADERIA EN EL ECUADOR

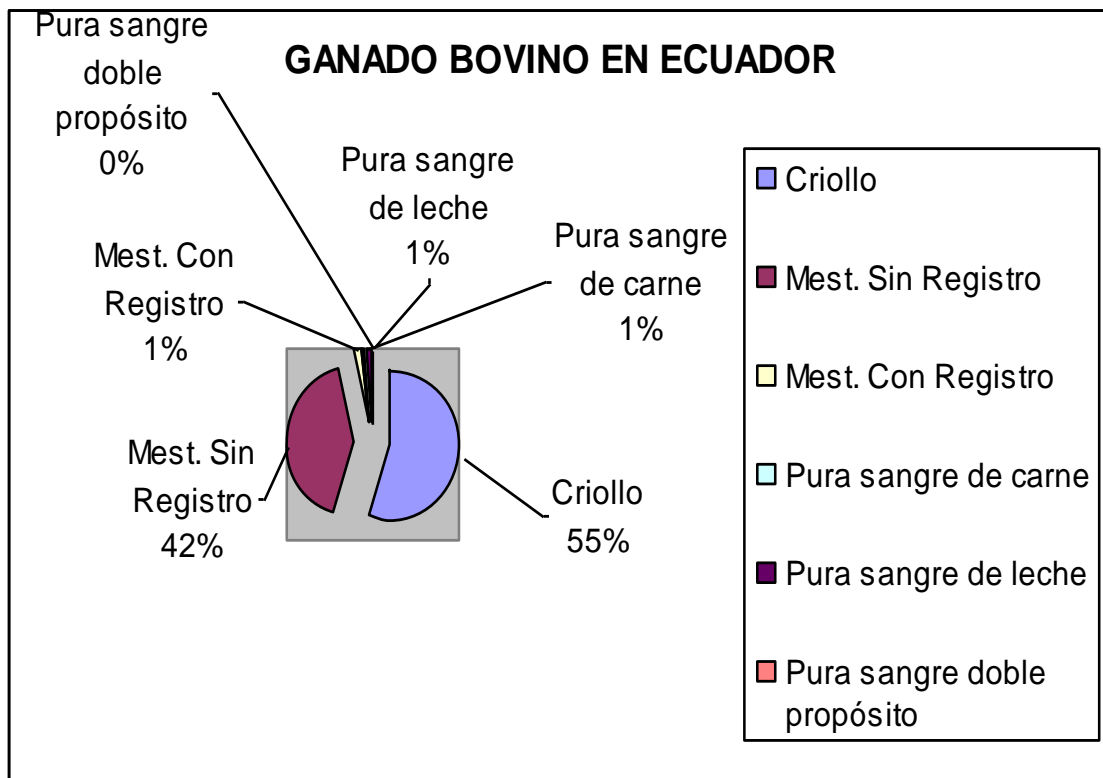
2. Estructura de la Producción por tamaño de Unidad Productiva Agropecuaria (UPAs)

La ganadería de leche representa una de las principales actividades del sector agropecuario del país, y es la actividad productiva más diseminada en el sector rural. Existen 12'355.831 hectáreas cultivadas en el Ecuador, de las cuales el 41% se dedican a la ganadería (Cadena, 2004).

Del total de leche producida en el Ecuador, el 75% se genera en pequeñas y medianas fincas (de 1 hasta menos de 100 ha.), mientras que el 25% restante proviene de las grandes UPAs de más de 100 ha (AGSO, 2005).

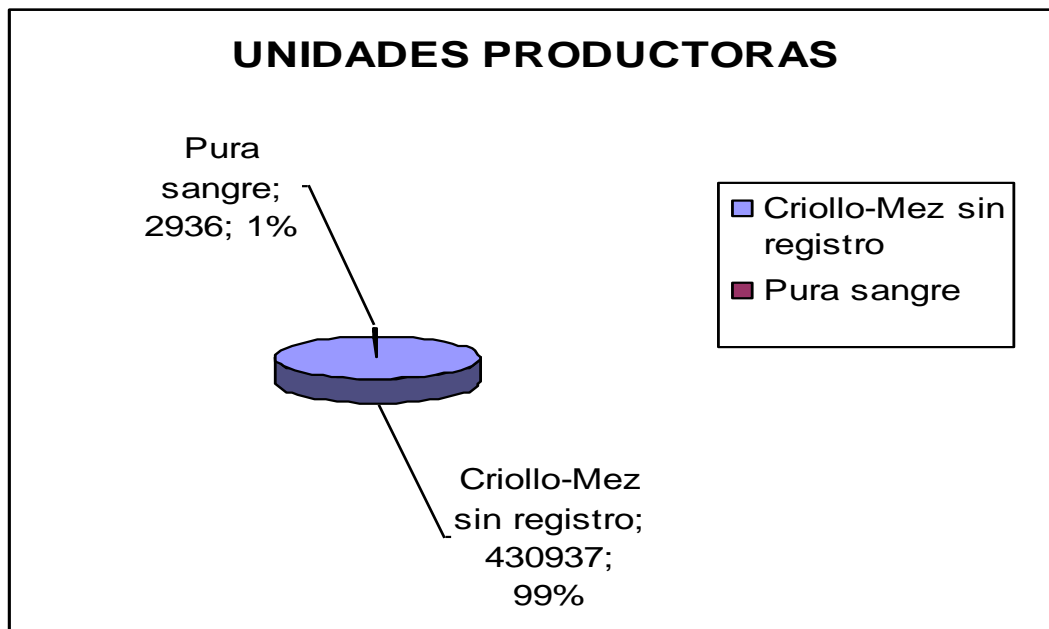
El 12% de la población ecuatoriana depende económicamente de la producción de leche, esto es más de 1'500.000 ecuatorianos (Cadena, 2004).

El ganado bovino en el Ecuador (Gráfico 4.1), está estimado en 4'486.020 cabezas desarrolladas en 842.882 Unidades Productivas (SICA, 2000). El 97% del total de animales corresponden a criollos y mestizos sin registros que se desarrollan en un 99% en Unidades Productoras (UPAs) pequeñas y medianas, con un nivel de manejo extensivo y baja productividad (Gráfico 4.2).



Fuente: INEC-MAG-SICA. III Censo Nacional Agropecuario. Junio 2000. Elaborado: Terán y Santillán, 2006.

Gráfico 4.1. Ganado bovino en el Ecuador.

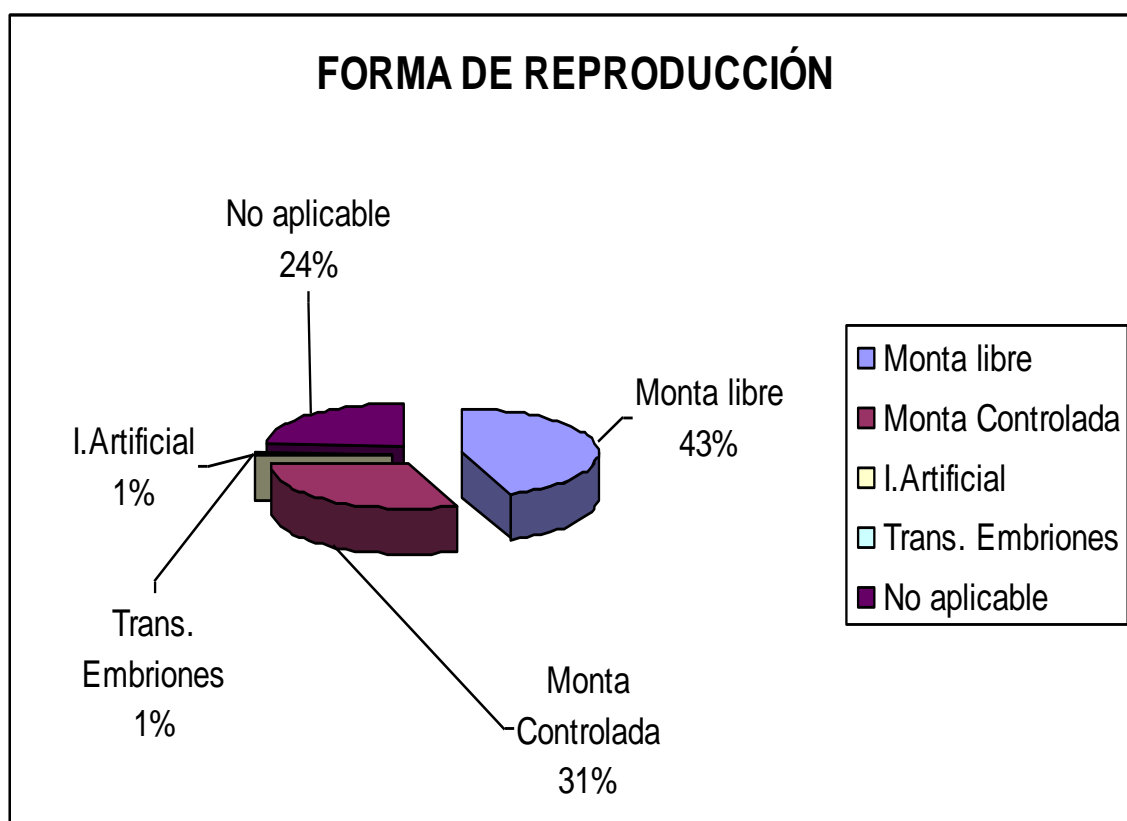


Fuente: INEC-MAG-SICA. III Censo Nacional Agropecuario. Junio 2000. Elaborado: Terán y Santillán, 2006.

Gráfico 4.2. Número de UPAs por tamaños y cabezas, según existencia de ganado bovino, en el Ecuador.

De las 4'486.020 cabezas desarrolladas en el país, el 45% se halla en la Sierra, el 40% en la Costa y el 15% en el Oriente (Vázquez y Saltos, 2005).

Una de las restricciones fundamentales que enfrenta el sector ganadero es la tecnificación de la reproducción de los bovinos, así tenemos que el 74% del manejo que se realiza en el país corresponde a la monta libre y monta controlada; el 24% no aplica manejo en la reproducción, y tan sólo el 2% maneja la reproducción con técnicas de inseminación artificial y transferencia de embriones (Gráfico 4.3) (SICA, 2000).



Fuente: INEC-MAG-SICA. III Censo Nacional Agropecuario. Junio 2000. Elaborado: Terán y Santillán, 2006.

Gráfico 4.3. Formas de Reproducción de los hatos bovinos del Ecuador.

3. Niveles Tecnológicos en finca

La producción ganadera del Ecuador históricamente ha sido de carácter extensivo, es decir, que el incremento en la producción se ha basado en la incorporación de más unidades de factor, principalmente pastizales y número de cabezas, más no en un mejoramiento de los rendimientos por unidad de factor, lo cual se evidencia en los bajos rendimientos tanto en producción de leche como en carne (SICA, 2000).

En base a un estudio realizado por el Proyecto para la Reorientación del Sector Agropecuario (PRSA), para determinar los parámetros zootécnicos del Ecuador, en base a muestras representativas de unidades productivas de las provincias de Cañar, Guayas, Manabí y Pichincha; se pudo observar que del total de Unidades de Producción Bovina investigadas, el 3% utilizaban sistemas productivos tecnificados, un 10% estaban semitecnificados y un 87% estaban muy poco tecnificados (SICA, 2000).

Una política de fomento pecuario requiere de un esfuerzo grande y continuo. Se tiene que atacar a la vez diversos frentes como; asesoramiento y transferencia de tecnología, producción de pastos y forrajes, sanidad, reproducción, selección, y mejoramiento genético, entre otras. Cambiar una raza en un hato bovino por medio del cruzamiento demora por lo menos 20 años, se puede citar el caso de varios países en los cuales muchos años de esfuerzo han sido anulados por la decisión de un gobierno de importar leche en polvo a precios subsidiados, con lo cual se ha reducido el precio a niveles que no permiten que sea rentable la producción local (Vélez *et al.*, 2000).

4. Evolución de Rendimientos (litros⁻¹ vaca⁻¹ día⁻¹)

El análisis de rendimientos productivos resulta particularmente importante ya que da cuenta de la evolución y el nivel tecnológico de la producción. La tecnología tiene como objetivo principal optimizar el rendimiento de los factores, por lo tanto, a mayores rendimientos de los factores es de esperarse un mayor nivel tecnológico (SICA, 2000).

En este sentido, los rendimientos de leche a nivel nacional han tenido un incremento más bien modesto entre 1974 y el año 2000, ya que pasaron de 3,9 litros⁻¹ vaca⁻¹ día⁻¹ a 4,4 litros⁻¹ vaca⁻¹ día⁻¹; lo que significa medio litro en un cuarto de siglo. Claramente este indicador sugiere que el nivel tecnológico en el país no ha evolucionado significativamente, conclusión que se refuerza si se observan otras variables cruzadas, como la raza, el área destinada a pastoreo y el hato bovino. La ganadería en el Ecuador continúa siendo un tipo de explotación más bien “extensiva” (para incrementar la producción permanece constante el rendimiento, y se incrementa la cantidad de factores) antes que “intensiva” (para incrementar la producción permanece constante la cantidad de factores y se incrementa el rendimiento de estos) (SICA, 2000).

Sin embargo, el análisis provincial muestra ciertas diferencias en la tendencia, como resultado de la especialización regional que solo se aprecia en períodos más o menos largos como entre los censos del 1974 y 2000. La provincia del Carchi, que fue la de mayor rendimiento nacional para el 2000, mostró el mayor incremento en los rendimientos. En poco más de 25 años pasó de 5,3 litros⁻¹ vaca⁻¹ día⁻¹ a 7,1 litros⁻¹ vaca⁻¹ día⁻¹; (manteniendo constante su tamaño relativo de hato 2%), lo que se explica por una mejora importante en la genética (raza) para producción láctea y manejo en fincas (SICA, 2000).

En las provincias de la costa, no se apreció una evolución favorable de los rendimientos, ya que esta región más bien se ha especializado en la producción de ganado de carne. Por ejemplo, Manabí, a pesar de tener el mayor número de cabezas de ganado a nivel nacional, su rendimiento está por debajo del promedio nacional, y pasó de 2,2 litros⁻¹ vaca⁻¹ día⁻¹ en 1974 a 2,6 litros⁻¹ vaca⁻¹ día⁻¹ en el año 2000 (SICA, 2000).

E. BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA PRODUCCIÓN ANIMAL

1. Composición de la leche

La leche es un sistema coloidal constituido por una solución acuosa de lactosa (5%), sales (0,7%) y muchos otros elementos en estado de disolución, en donde se

encuentran las proteínas (3,2%) en estado de suspensión y la materia grasa en estado de emulsión. El extracto seco total de la leche es como promedio del 13,1 % y el extracto seco desgrasado del 9,2% (Brochu *et al.*, 1991).

La composición general de la leche se muestra en la Tabla 4.1, en la que los datos cuantitativos son sólo aproximados, ya que varían en función de múltiples factores. La composición exacta de una muestra de leche únicamente se puede conocer mediante su análisis químico.

Tabla 4.1. Composición general de la leche.

Componentes mayoritarios.

• Agua	86,9%
• Materias grasas	3,9%
• Proteínas y sustancias nitrogenadas no proteicas	3,2%
• Carbohidratos	51%
• Sales	0,9%

Componentes minoritarios

- Enzimas.
- Vitaminas.
- Pigmentos. (Carotenos, xantofilas, riboflavina).
- Células diversas (células epiteliales, leucocitos, bacterias, levaduras, mohos).
- Otros elementos (dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno y otros gases).
- Sustancias extrañas.

Fuente: Brochu *et al.*, 1991. Elaborado: Terán y Santillán, 2006.

Desde el punto de vista macroscópico para Cunningham y Enrique (2000), la leche se puede describir como un sistema polifásico que contiene agua, grasa emulsificada, micelas de caseína en estado coloidal y proteínas, lactosa, sales y micro nutrientes en solución. Desde una perspectiva mucho más detallada, es común, por ejemplo, que algunas de sus proteínas se encuentren en distintas variantes genéticas, con propiedades funcionales ligeramente diferentes, como se observa en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. La composición de la leche en diferentes razas de bovinos.

Componentes	Holstein alemana	Jersey	Parda suiza
Agua	87,0	85,4	87,1
Grasa	4,2	5,3	3,9
Proteína	3,4	3,9	3,5
Lactosa	4,7	4,7	4,6
Cenizas	0,75	0,75	0,75

Fuente: Schlimme y Buccheim, 2002. Elaborado: Terán y Santillán, 2006

2. Proteínas lácteas

Para Cunningham y Enrique (2000), la leche es un supersistema biológico muy complejo, intrínsecamente inestable, con sistemas dentro de otros sistemas, siendo todos ellos importantes para optimizar los rendimientos y calidad. Por ejemplo, dentro del sistema de de leche se encuentra el subsistema proteínas; dentro de éste se encuentra el subsistema caseínas y dentro de este se encuentran las distintas caseínas.

Las proteínas son elementos constitutivos esenciales de toda célula viviente y tienen una gran importancia en la leche y los productos lácteos. La leche contiene como término medio un 3.2% de proteínas, de las que el 80% son caseínas (Brochu *et al.*, 1991). Dentro de las proteínas se distinguen, las caseínas (α_1 -caseína, α_2 -caseína, β -caseína y κ -caseína); y las proteínas del lactosuero; (α -lactoglobulina y β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina); y, las sustancias nitrogenadas no proteicas.

En estudios realizados por Schlimme y Buccheim (2002), se determina claramente que las necesidades individuales de cada aminoácido son cubiertas de sobra con las proteínas lácteas. En relación con esto hay que hacer notar que la proporción de proteína láctea en el conjunto de las proteínas de la dieta en los países de occidente es de alrededor del 20% (la de los niños en edad preescolar entre 50 y un 60%) y en los países pobre de menos del 6%.

a. Caseínas

Para Schlimme y Buccheim (2002), el principal grupo de proteínas lácteas lo constituyen las caseínas, que se sintetizan en la glándula mamaria. La falta de homogeneidad de las caseínas, la describió por primera vez Mellander (1939) usando la electroforesis. Se conoce una serie de variantes genéticas, algunas de las cuales aparecen preferentemente en algunas razas.

La fracción de caseínas está formada por los siguientes componentes con el contenido medio (en porcentaje en peso del total de las caseínas) que aparece a continuación: α_{s1} -caseína (38%), α_{s2} -caseína (10%), β -caseína (36%) y κ -caseína (13%). A éstas se les une además, no como proteína láctea original, la γ -caseína (3%), que se libera a partir de la β -caseína por acción del enzima lácteo – plasmina. También pertenece a las caseínas de la fracción proteosa – peptona que está constituida mayoritariamente por fragmentos N-terminales de β -caseínas liberados por plasmita (Schlimme y Buccheim 2002).

b. Estructura y composición de las micelas de caseína

Las caseínas se encuentran en la leche fresca no refrigerada dispersas en forma coloidal en un 95%. Estas estructuras más o menos redondas (las micelas de caseína) tienen diámetros que oscilan entre alrededor de 0,02 y 0,4 μm (algunas incluso de 0,6 μm) y contienen entre 20 y 300.000 moléculas de caseína. El número de micelas de caseína en un mililitro de leche es de 10^{14} , la leche de diferentes especies contiene toda la caseína en forma de dispersión coloidal, aunque la distribución de tamaños de las micelas de caseína presente diferencias considerables entre ellas. (Schlimme y Buccheim 2002).

Estudios realizados por Larson (1979); Mephram, Gaye y Mercier (1982); Mercier y Villote (1993), citados por Schlimme y Buccheim (2002) sobre la formación de las micelas de caseína nos indican que se producen en el interior de las vesículas de Golgi de las células de la glándula mamaria, de las cuales son liberadas al lumen de la glándula

junto con otros componentes del plasma lácteo (proteínas del suero, lactosa, minerales, algunas enzimas, vitaminas y otros componentes minoritarios) mediante exocitosis.

En estudios de microscopía electrónica realizados por Buccheim y Welsch (1973) citado por Schlimme y Buccheim (2002), se pudo observar la glándula mamaria en período de lactación, confirmando que solo aparecen en cada vesícula una o muy pocas micelas de caseína por agregación de un sinnúmero de subunidades (submicelas) de entre 10 y 20 nm. Este proceso de condensación está provocado claramente por el transporte de calcio y del fosfato inorgánico desde el citoplasma a la vesícula.

La fracción micelar de caseína de la leche cruda tiene en promedio de composición, en la cual la masa seca de la fracción está constituida en un 92 y 93% por caseína y un 7 – 8% por componentes inorgánicos, fundamentalmente calcio y fosfato-citrato. La contribución relativa (en peso) de las cuatro caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β y κ) es en promedio, en la leche de vaca, 3:0, 8:3:1. Esta proporción relativa es, con excepción de al inicio y al final de la lactación, bastante constante. La cantidad de componentes inorgánicos en las micelas de caseína está sujeta por el contrario a grandes variaciones individuales (entre alrededor de 6 y 10/100 g de caseína) sobre todo en el caso de enfermedades de la ubre (mastitis). Las micelas de caseína tienen una estructura suelta y porosa ya que sólo alrededor de la mitad de su volumen está ocupado por submicelas; el resto está ocupado por una fase acuosa, el suero lácteo. Se cree que el tamaño del poro es de unos nanómetros de tal manera que las moléculas pequeñas pueden difundir libremente en la micela. Si se considera también el agua unida (inmovilizada) a la superficie de la micela, se obtienen valores de voluminosidad de la micela de alrededor de 4 ml, por gramo de caseína (Schlimme y Buccheim 2002).

c. Estructura de los genes de las proteínas lácteas

La estructura y la expresión de los genes de las proteínas lácteas se han investigado por Threadgill y Womack (1990) en bovinos. En el estudio en bovinos cubanos realizado por Uffo (2000), cita a varios investigadores como Vilotte *et al.*, (1991); Vilotte y Soulier (1992); Bleck y Bremel (1993); Provot *et al.*, (1995), los mismos que

realizaron investigaciones en al menos 10 especies incluyendo los rumiantes y se han descrito la secuencia de nucleótidos de muchos ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) y genes.

Estudios realizados por Martin y Grosclaude (1993), citados por Uffo (2000), sobre la unidad de transcripción de los genes de las proteínas lácteas nos indican que está formada por varios intrones y contiene una dirección 5' a 3', la señal de poliadenilación AATAAA, varias secuencias consenso de “*splicing*” y el sitio *cap*. Por delante de la unidad de transcripción se encuentra la caja TATA y posibles cajas CAAT (Alexander, *et al.*, 1988), con la señal de inicio de la transcripción para la ARN polimerasa II.

La base molecular del polimorfismo de las proteínas de la leche es la sustitución o la supresión de aminoácidos en la estructura primaria de las proteínas, generadas por cambios de nucleótidos en la secuencia del gen que codifica para estas (Le Thi *et al.*, 2004).

d. Estructura del gen de la κ -caseína

La κ -caseína (κ -CN) se encuentra en la micela de caseína en una proporción de alrededor del 13%. Se conocen actualmente dos variantes alélicas (A y B) que se denominan κ -caseína A y κ -caseína B. La estructura primaria (Figura 4.4) fue elucidada a principios de los años 70 por Mercier, Brignon y Ribadeau – Dumas y confirmada en 1984, excepto la posición 81 (Asp en Asn), mediante el análisis de la secuencia del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc). Además de la estructura primaria de la κ -caseína bovina, se conoce también la estructura de otras especies: humana (análisis de la secuencia de aminoácidos), ratón (análisis de ADNc), oveja y cabra (ambas por secuencia de aminoácidos) (Schlimme y Buccheim, 2002).

Schlimme y Buccheim (2002), reportan que la cadena peptídica de la κ -caseína está constituida por 169 aminoácidos y tiene una masa molecular de 19,007 g/mol,

Las secuencias de los ADN complementarios (ADNc) de la κ -caseína han sido descritas en varias especies por Nakhasi *et al.*, (1984); Gorodetsky y Kalendi (1987); Furet *et al.*, (1990); citado por Uffo y Martínez (2002).

Los estudios parciales realizados por Alexander *et al.*, (1988), y finalmente descrita por Mercier *et al.*, (1990) sobre el aislamiento y caracterización del gen la κ -caseína en bovino (ver ANEXO A y B), representan una unidad de transcripción de 13 Kb de longitud dividida en cuatro intrones y cinco exones, y confirman el polimorfismo existente entre variantes A y B. Esto esta expresado en la secuenciación del exón 4 que esta distribuido en un fragmento que va desde +4930 a +5446 nucleótidos (Figura 4.2). La primera variación se encuentra en la posición +5309 en donde “C” es “T” en la variante κ -caseína B, el cambio es ACC (Thr) por ATC (Ile); otra variación se encuentra en la posición +5345 en donde “A” es “C” en la misma variante, el cambio es GAT (Asp) por GCT (Ala) (Access Gene Bank, 2006).

4930	c	gctgtgagaa	agatgaaga	ttctcagtg	acaaaatagc	caaataatc
4981	ccaattcagt	atgtgctgag	taggtatcct	agttatggac	tcaattacta	ccaacagaaa
5041	ccagttgcac	taattaataa	tcaattctg	ccatacccat	attatgcaaa	gccagctgca
5101	gttaggtcac	ctgcccfaat	tcttcaatgg	caagtttgt	caaatactgt	gcctgccaag
5161	tcctgccaag	cccagccaac	taccatggca	cgtcaccac	acccacattt	atcatttatg
5221	gccattccac	caaagaaaaa	tcaggataaa	acagaaatcc	ctaccatcaa	taccattgct
	ACC es Thr Variante A		5309 (C es T)			
	ATC es Ile Variante B		↓			
5281	agtggtagc	ctacaagtac	acctaccacc	gaagcagtag	agagcactgt	agetactcta
	5345 (A es C)	GAT es Asp Variante A				
	↓	GCT es Ala Variante B				
5341	gaagattctc	cagaagtat	tgagagccca	cctgagatca	acacagtcca	agttacttca
					5446 Intron IV	
					↓	
5401	actgcagtct	aaaaactcta	aggagacatc	aaagaagaca	acgcaggtaa	ataaggcaaa

nte: Access Gene Bank, 2006. Elaborado: Terán y Santillán, 2006.

Figura 4.2. Secuencia del exón IV y el polimorfismo en el gen de la κ -caseína.

Estudios realizados por Swaisgood (1975); Eigel *et al.*, (1984), citado por Womack (1998), concluyen que la principal característica de la κ -caseína es que presenta propiedades químicas y físicas únicas al compararla con las restantes proteínas lácteas, las cuales tienen consecuencias inmediatas en el estado físico de la leche, como son:

- Se mantiene soluble en soluciones de calcio en condiciones en las que precipita las otras caseínas debido a que carece de MPS (sitio mayor de fosforilación).
- Tiene la capacidad de estabilizar a otras caseínas contra la precipitación por calcio formando micelas coloidales.
- Es la única de las caseínas que contiene cadenas laterales de carbohidratos y residuos de cisteína.
- Se hidroliza por la acción de la enzima renina, originando la desestabilización de las micelas y la formación de precipitados.

Se han descrito 10 alelos del gen κ -caseína. Los más frecuentes son CASK^A y CASK^B (Tabla 4.3), los restantes aparecen muy raras veces, las que se diferencian en la sustitución de varios aminoácidos (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1991; Klauzinska *et al.*, 2001). Schlieben *et al.*, (1991) describen la secuenciación de la variante CASK^E, después de haber sido identificada por PCR/RFLP, lo que proporciona la diferenciación directa entre esta y las variantes A y B. Miranda *et al.*, (1993) desarrollaron una PCR para diferenciar las variantes C y E. Existe también un microsatélite en el intrón III de este gen (Lien y Rogne 1993) del que se han detectado seis alelos (Levéziel *et al.*, 1994). En (1999), Prinzenberg *et al.*, reportaron tres alelos para esta proteína: H, I, A1. Los dos primeros se originan por cambios de bases, y el tercero aparece como producto de una mutación silente en el tercer codón de la prolina en la posición 150, referido al alelo A. La última variante detectada es la J, que fue encontrada por Mahé *et al.*, (1999) en ganado africano Bavorí (*B. taurus*) y se caracteriza por una sustitución en la posición 155 de una serina por una arginina, comparándola con la variante B.

Tabla 4.3. Diferencias aminoacídicas entre las variantes de la κ -caseína bovina.

Variante	Posiciones aminoacídicas							
	10	97	104	135	136	148	150	155
A*	CGC (R)	CGT(R)	AGC(S)	ACC(T)	ACC (T)	GAT(C)		AGC (S)
A1							**	
B					ACT (I)	GCT (A)		CGC (R)
C		CAT (H)			ACT (I)	GCT (A)		
E								GGC (G)
F	CAC (H)							
G		TGT(C)						
H				ACT(I)				
I			GCT(A)					
J								AGC (S)

*Variante Base. ** Mutación silente en el tercer codón de la prolina.

Fuente: Uffo, 2000.

Se han encontrado variación en la región 5' del gen κ -caseína relacionada con sitios de regulación potencial y posiblemente involucrada en la expresión del gen, por lo que es posible que la diferencia en la expresión de los alelos A o B de κ -caseína esté relacionada con alguna de estas mutaciones (Kaminski, 1996). Debeljak *et al.*, (2000) se refieren a la expresión diferencial debido al control post-traducciona que determina las diferencias en el contenido de esta proteína en la leche. Se ha reportado otra región de polimorfismo relativa a su sitio SINE (Short Interspersed Elements) en el intrón II del gen de la κ -caseína (Damián *et al.*, 2000).

La tipificación de este gen se ha realizado incluso en embriones bovinos utilizando la PCR, a partir de pequeñas cantidades de ADN y digiriendo con enzimas de restricción (Osta *et al.*, 1993; López y Vásquez 2004).

e. Loci de la κ -caseína relacionado con características de producción lechera.

Estudios realizados por Giovambattista *et al.*, (1998), expresan que existen evidencias bien documentadas que permiten correlacionar algunas de las variantes de las proteínas de la leche con el rendimiento y la composición del producto obtenido McLean *et al.*, (1984); Cowan *et al.*, (1990); Ng-Kwai-Hang *et al.*, (1990); Boland *et al.*, (1992). Sin embargo, diferentes investigadores han llegado resultados contradictorios. Así por ejemplo, para cierto locus, algunos autores han reportado una alta correlación entre un alelo o genotipo particular de la proteína de la leche y los caracteres de producción lechera; mientras que otros han hallado un pequeño o ningún grado de asociación. Las diferencias observadas pueden deberse al método estadístico empleado, al reducido número de marcadores y animales analizados, y al efecto de la recombinación.

κ -caseína (κ -CN): Ésta proteína constituye aproximadamente el 13 % de las caseínas totales. Mediante corridas electroforéticas, así como también a nivel de ADN, se han descrito dos variantes alélicas mayoritarias: A y B. Aschaffenburg (1965); Eigel *et al.*, (1984); Levéziel *et al.*, (1988); Denicourt *et al.*, (1990); Pinder *et al.*, (1991); citados por Medrano y Aguilar-Cordoba (1990).

La leche producida por animales de genotipo BB contiene mayores niveles de proteínas, grasa y sólidos totales (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984; McLean *et al.*, 1984, 1992; Geldermann *et al.*, 1985; Gonyon *et al.*, 1987; Aleandri *et al.*, 1990; Gibson *et al.*, 1990; Hines *et al.*, 1990; Rahali y Menard, 1991; Van Eenennaam y Medrano, 1991; Boland *et al.*, 1992; Bovenhuis *et al.*, 1992; Cowan *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1992; van den Berg *et al.*, 1992; Famula y Medrano, 1994; Velmala *et al.*, 1995). Además este genotipo se ha correlacionado con un mayor rendimiento en litros de leche (Lin *et al.*, 1986). Se calcula que esta variante puede ofrecer un promedio de 2.000 Kg. más de leche durante toda la vida productiva del animal. Estas observaciones fueron confirmadas en diferentes razas como Holstein, Friesian, Jersey, Ayrshire, Guernesey y otras. (Giovambattista *et al.*, 1998).

Sin embargo, manifiesta Giovambattista *et al.*, (1998), que en las diferentes razas, no siempre se presentan las mismas asociaciones marcador - QTL. Si tenemos en cuenta que el ligamiento entre el QTL y el marcador genético es incompleto, podrían existir en la población diferentes haplotipos marcador-QTL. De este modo, el alelo B de κ -caseína podría estar ligado al alelo de alta producción del QTL en algunos animales, mientras que en otros estaría ligado a la variante de baja productividad. Por lo tanto, los efectos estimados del QTL sobre el rasgo cuantitativo se verán sesgados por efecto de la recombinación. Así por ejemplo, Cowan *et al.* (1992) observaron que el alelo B de κ -caseína estaba asociada a una disminución en el porcentaje de grasa. Mientras que, Haenlein *et al.*, (1987); Sabour *et al.*, (1993); y Ron *et al.*, (1994) no encontraron asociación entre los alelos de κ -caseína y los caracteres de producción lechera. La leche producida por animales con genotipo κ -caseína BB posee propiedades superiores para la manufacturación de queso (Feagan *et al.*, 1972; Schaar *et al.*, 1984, 1985; Marziali *et al.*, 1986; Aleandri *et al.*, 1990; Rahali y Menard, 1991; Lin *et al.*, 1992; van den Berg *et al.*, 1992). La leche de tipo BB tienen menor tiempo de renina, cuajo más firme, y un mayor contenido en proteínas y sólidos totales McLean y Schaar (1989).

La leche derivada de animales κ -caseína AA tiene menor porcentaje de κ -caseína, y como consecuencia de esto una mayor proporción de micelas grandes (Morini *et al.*, 1975; Schmidt, 1980; McLean *et al.*, 1982; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987). Por el contrario, la leche de animales κ -caseína BB presenta mayor proporción de κ -caseína y micelas más pequeñas. Esta característica explica la formación de un cuajo más firme y una mayor retención de sólidos, lo que resulta en un rendimiento superior durante la producción de queso, comparada con la leche producida por animales con genotipo κ -caseína AA (Schaar, 1981). (Postiglioni *et al.*, 2002).

La leche de los animales con genotipo κ -caseína AB contiene una mayor proporción de κ -caseína B. Esto sugeriría que dicho alelo tiene un mayor nivel de expresión con respecto a la variante A en la glándula mamaria de los bovinos. La diferencia en la expresión de los alelos, explicaría las observaciones hechas previamente, que evidenciaban que la proporción de κ -caseína en la leche depende del genotipo del

animal (BB > AB > AA), Mc Lean *et al.*, 1984; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1987, citado por Van Eenennaam y Medrano (1998).

Las diferencias en el contenido proteico de la leche, entre los animales κ -CN^A y κ -CN^B, se estimó en aproximadamente un 3%. Este locus puede explicar alrededor del 4% de la variación total en el contenido proteico. (Haley, 1995).

3. Estudios de variabilidad genética mediante el uso de Marcadores Moleculares (MM)

Uffo (2000) reporta, que la variación de naturaleza cuantitativa y de origen genético dentro de las poblaciones se presenta en dos formas básicas: mutantes raros y polimorfismo genético. Atendiendo al valor de la frecuencia, si la variante más escasa aparece con una frecuencia menor del 1% se denomina mutante raro, pero si ésta es mayor que este valor es un polimorfismo genético. Así pues, Berovides y Alfonso en 1987 definieron este último como la ocurrencia dentro de una población de variantes discontinuas de origen genético, con una frecuencia del gen que no puede ser explicada por la acción exclusiva de mutaciones, por ser este un evento sumamente raro.

La variabilidad genética es un atributo que no puede ser exhaustivamente medido. Es imposible examinar cada gen en cada individuo de una especie dada para obtener una enumeración completa de la variación genética de la especie; sin embargo, si se toma una muestra de una población es posible estimar su variabilidad genética (Entrala, 2000), al utilizar un carácter o marcador que propicie la medición de dicha variabilidad.

Uffo (2000), concuerda con otros investigadores, en que el polimorfismo genético o variación de origen genético ha sido muy estudiado en poblaciones naturales, pues permite el análisis de fenómenos como cantidad de variabilidad genética y frecuencia de mutaciones a través de caracteres de fácil medición y de base genética conocida, con poca influencia del ambiente en su expresión fenotípica.

Hasta mediados de la década de los 60', los marcadores usados en genética y mejora animal estaban controlados por genes asociados a caracteres polimórficos, en general fáciles de identificar visualmente (Ferreira y Grattapaglia, 1995). Pero solo un pequeño número de marcadores morfológicos permitían encontrar asociaciones significativas entre estos y los caracteres con importancia económica. Por sus limitaciones surgieron los marcadores isoenzimáticos que eran accesibles a un mayor número de especies y brindaban mejores resultados.

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular aparecieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel de ADN. Inicialmente el descubrimiento de las enzimas de restricción permitió el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción. Posteriormente, con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction (PCR), se desarrollaron nuevos métodos de detección de marcadores moleculares; estos últimos se definen como todo aquel fenotipo molecular proveniente de un gen expresado, como en el caso de las isoenzimas o las proteínas (marcadores bioquímicos), o de un segmento específico de ADN (correspondiente a regiones expresadas o no del genoma) (Arrkis, 2004).

Por Marcador Molecular se define a cualquier fenotipo molecular originado de la expresión de un gen (ejemplo, isoenzimas) o de un segmento específico de ADN (correspondiente a regiones del genoma que se expresan o no) (Ferreira y Grattapaglia, 1995).

En las determinaciones de la variabilidad genética, los marcadores ideales cumplen una serie de características: elevada capacidad de detectar altos niveles de polimorfismo, alta heredabilidad, gran capacidad para acceder a todas las regiones del genoma, independencia del estado físico y de desarrollo del individuo, facilidad de obtención, detección por métodos económicos, independencia de las condiciones ambientales y la posibilidad de determinación en cualquier tipo de células que contenga núcleo (Ferreira y Grattapaglia, 1995). Estas constituyen algunas de las ventajas de los marcadores moleculares sobre los morfológicos e isoenzimas; otras ventajas radican en su

capacidad de detección de mutaciones silenciosas, que no originan cambios de aminoácidos. (Entrala, 2000).

Los polimorfismos detectados en el ADN están ocasionados por diferencias en cuanto al número de determinadas regiones no codificantes, que se encuentran dispersas en el genoma (regiones repetidas) o por mutaciones puntuales. En función de estas características se pueden clasificar los diferentes métodos de detección de polimorfismos, que será expuesto a continuación enfatizando en el utilizado en este trabajo; los marcadores asociados a variaciones debidas al número de repeticiones en su secuencia y los marcadores que detectan cambios puntuales en el genoma, que pueden ser detectables o no por enzimas de restricción (Uffo, 2000).

4. Análisis genético en Bovinos

La mayoría de los caracteres de interés económico en el ganado lechero son cuantitativos. Es decir que el fenotipo observado es el resultado de la interacción entre numerosos loci, que pueden ser denominados QTLs (Quantitative Traits Loci), y la alta influencia de los factores ambientales. En consecuencia, cada uno de estos QTLs sólo puede explicar una pequeña fracción de la varianza total.

Estas características dificultan la identificación de los animales genéticamente superiores para la producción. Es por esta razón que el análisis de los loci de caracteres cuantitativos puede mejorar la precisión, y por lo tanto la intensidad de la selección. (Giovambattista *et al.*, 1998).

Así mismo, Postiglioni *et al.*, (2002); en base a estudios recientes, que entre el 2 y el 10% de la variación en la producción de leche y grasa en las vacas lecheras puede explicarse a través del efecto materno. La influencia materna podría deberse al efecto de los genes nucleares de origen materno, al ambiente intrauterino o a genes mitocondriales.

Brown *et al.*, (1989) analizaron mediante enzimas de restricción un fragmento de 4,3 kb del ADN mitocondrial (ADNmt) en 35 linajes maternos de la raza Holstein. La presencia del sitio de restricción *Hpa* II en la posición 360 del fragmento estudiado, se asoció con un bajo porcentaje de grasa en leche. Por otra parte, los marcadores moleculares utilizados en este estudio evidenciaron que los pedigríes no son suficientes para separar los verdaderos linajes citoplasmáticos en análisis genéticos cuantitativos. Ron *et al.*, (1993), analizaron linajes maternos de alta y baja producción lechera en la raza Holstein, a través del estudio de los polimorfismos presentes en la región del D-loop del ADNmt. Ninguno de los sitios polimórficos evidenció efectos significativos sobre la producción lechera (Felmer y Butendieck, 1998).

Así mismo la utilización de los microsatélites para el mapeo de QTLs ha permitido localizar regiones cromosómicas, que podrían ser portadoras de genes implicados en la producción lechera. Así por ejemplo, Georges *et al.*, 1993 mapearon en la raza Parda Suiza un microsatélite (TGLA116) estrechamente ligado al gen de la enfermedad del temblor (“weaver disease”). Como se mencionó anteriormente, dicha patología se asocia con el aumento de la producción lechera. Por ende, el análisis del microsatélite, no sólo permite la identificación de los animales portadores de dicha enfermedad, sino que también posibilitará estudiar el efecto de la región cromosómica correspondiente, sobre la producción lechera en esta raza y en otras razas lecheras. (Giovambattista *et al.*, 1998).

Además el empleo de esta metodología ha permitido la localización de otras regiones potencialmente portadoras de QTLs relacionados con producción lechera. De este modo, Ron *et al.*, (1994) utilizaron 10 microsatélites para investigar QTLs asociados a caracteres de producción lechera, en siete familias de Holstein Israelita. En este estudio se identificó un efecto significativo del marcador genético D21S4 sobre litros de leche y cantidad de proteínas en una de las familias analizadas. Georges *et al.*, (1995), al estudiar 14 familias de medias hermanas paternas de la raza Holstein, a través del uso de 159 microsatélites, detectaron QTLs para producción lechera en cinco cromosomas (BTA1, 6, 9, 10, 20). La presencia de un QTL para la producción lechera en el cromosoma BTA6 fue confirmado independientemente por Spelman *et al.*, (1996), mediante la metodología de

Idénticos por Descendencia (IBD). Recientemente, Ashwell *et al.*, (1996), utilizaron 16 microsatélites para identificar potenciales QTLs en 7 familias de Holstein. Todos los marcadores, excepto 3 de ellos, fueron asociados con efectos significativos para al menos un carácter de producción lechera en una de las familias estudiadas (BTA8, 14,18, 21, 23, 26 y 27). Vilkki *et al.*, (1997) estudiaron 453 toros de la raza Finnish Ayrshires, los que fueron tipificados para seis microsatélites ubicados en el cromosoma 9. Los resultados obtenidos indicarían la posible existencia de un locus, en el BTA9, que afectaría la producción de proteínas y leche (Giovambattista *et al.*, 1998).

a. QTLs en el ganado lechero

Numerosos estudios realizados durante las últimas cuatro décadas han puesto de manifiesto correlaciones estadísticamente significativas entre marcadores genéticos y caracteres de producción lechera; según cita Giovambattista *et al.*, en su reporte en 1998, en el mismo que añade que los primeros estudios sobre marcadores moleculares en animales domésticos fueron enfocados principalmente hacia el análisis de los grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos.

El más importante e influyente de estos estudios fue el llevado a cabo por Neimann-Sorensen y Robertson (1961); en el ganado lechero danés. De los 10 grupos sanguíneos analizados por estos autores sólo el grupo B evidenció un efecto significativo sobre el porcentaje de grasa en leche, concluyendo que dicho marcador explicaría entre el 1,5 y 3,9% de la varianza total. Resultados similares fueron encontrados, en el ganado sueco, por Andersson-Eklund *et al.*, (1990); mientras que Brum *et al.*, (1967) observaron, en la raza Holstein, asociaciones entre el grupo sanguíneo E con producción de grasa y leche, entre el grupo sanguíneo B con porcentaje de grasa en leche, y asociaciones entre el grupo sanguíneo S con diferencias en la producción de grasa. Geldermann *et al.*, (1985) encontraron asociación entre el grupo sanguíneo C con rendimiento en litros de leche y cantidad de grasa; y entre el grupo sanguíneo Z con porcentaje de grasa. Por otra parte, Gonyon *et al.*, (1987) observaron también, en la raza Holstein, asociaciones entre al grupo sanguíneo F y porcentaje de grasa. (Felmer y Butendieck, 1998)

Uffo en el 2000, cita que en cuanto a los polimorfismos bioquímicos, Brum *et al.*, (1967) hallaron en la raza Holstein, asociaciones entre las variantes alélicas de las transferrinas (Tf) con diferencias en el rendimiento de leche y grasa. Gelderman *et al.*, (1985), al estudiar tres familias de medias hermanas de la raza Friesian, observaron asociaciones entre las variantes de postalbúmina (Pa) con rendimiento en litros de leche, y entre amilasa-1 (Am-1) con porcentaje de grasa. Resultados similares fueron reportados para el ganado sueco por Andersson-Eklund y Rendel (1993), quienes estudiaron la asociación entre las variantes del locus Am-1 con el valor reproductivo del contenido de grasa en leche.

A pesar del esfuerzo realizado, los estudios de correlación entre los grupos sanguíneos y los polimorfismos bioquímicos con los caracteres de producción lechera no lograron grandes avances, más allá de los resultados mencionados anteriormente. Por otra parte, diferentes autores llegaron a resultados contradictorios. Mientras que algunos reportaban una alta asociación para un locus determinado, otros grupos no hallaban asociación alguna. Estas contradicciones podrían haber sido consecuencia de los diferentes métodos estadísticos y diseños experimentales utilizados en cada caso.

En los últimos años, el enfoque fue trasladado hacia la búsqueda de loci candidatos y/o hacia el rastreo del genoma mediante el uso simultáneo de un gran número de marcadores moleculares altamente polimórficos, del tipo microsatélite. Se ha definido a los loci candidatos como aquellos genes que por su función biológica participarían en la expresión de un carácter cuantitativo y por lo tanto podrían explicar un porcentaje de su varianza fenotípica. Pueden mencionarse a modo de ejemplo las proteínas de la leche, la prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH), el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), etc. (Giovambattista *et al.*, 1998).

F. HERRAMIENTAS DE INGENIERIA GENÉTICA

La Tecnología del ADN recombinante no se desarrolló con mucha rapidez, comenzó con los primeros estudios sobre genética de algunas bacterias y los virus que las infestan. Solo después de varios años de estudio y de acumulación de conocimientos se hizo factible la tecnología que disponemos actualmente.

Las bacterias han proporcionado a los investigadores enzimas específicas, conocidas como enzimas de restricción, las cuales cortan las moléculas de ADN sólo en lugares específicos. La tecnología de ADN recombinante también depende de una propiedad fundamental de las moléculas de ácidos nucleicos, la capacidad de las secuencias de nucleótidos complementarios de poder parearse por medio de enlaces hidrógeno específicos. (Solomon *et al.*, 2001).

1. Enzimas de Restricción

Un avance importante en el desarrollo de la tecnología de ADN recombinante fue el descubrimiento de enzimas bacterianas conocidas como enzimas de restricción, las cuales pueden cortar moléculas de ADN sólo en secuencias de bases específicas. Por ejemplo, una enzima de restricción llamada *HindIII* reconoce y corta una molécula de ADN en la secuencia de bases 5'-A AGCTT-3', en tanto que otra conocida como *EcoRI*, corta la secuencia 5'-GAATTC-3' (Solomon *et al.*, 2001).

a. Generalidades

A principios de los años sesenta, Bertani, Weigle y Arber demostraron en forma independiente que la modificación inducida por el hospedero ocurre en el nivel del ADN del fago, y el fenómeno de restricción es consecuencia de la degradación por hidrólisis enzimática del ADN viral que no ha sido modificado. El ADN de la bacteria hospedera y otros ADNs presentes en dicha célula son modificados por la adición de grupos metilo (CH³) en sitios específicos, los cuales son normalmente reconocidos por un tipo de enzimas conocidas como *enzimas de restricción*, las cuales solamente pueden

degradar ADN no metilado. Así, la metilación de una base en particular presente en la secuencia de nucleótidos reconocida por la enzima, impide la hidrólisis y ruptura del ADN en la región de ésta secuencia (Herveg y Barcia-Macay, 2004).

Las enzimas de restricción, también conocidas como endonucleasas, son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia que reconocen. Las mismas permiten cortar ADN de hebra doble, donde reconocen secuencias palindrómicas.

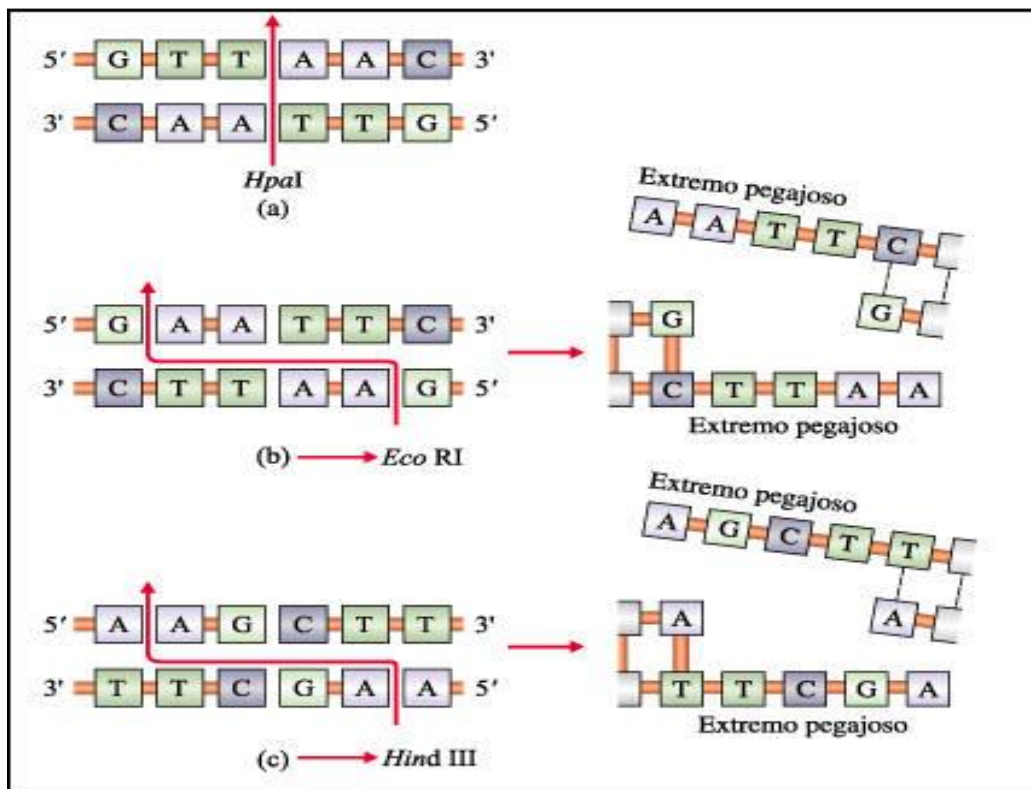
Son extraídas de organismos procarióticos (bacterias), donde actúan como un mecanismo de defensa, para degradar material genético extraño que entre en la célula. Las bacterias tienen la capacidad de metilar su ADN, lo cual sirve para distinguir entre el ADN extraño y el ADN propio. Las enzimas de restricción no pueden cortar ADN metilado, de este modo solo afectan el ADN extranjero y no el ADN bacterial. (Rivera y Maldonado, 2005).

b. Características

La característica esencial de las enzimas de restricción, que las hizo indispensable para la tecnología del ADN recombinante, es que escinde el ADN sólo en secuencias de nucleótidos muy específicas, cuya longitud varía entre cuatro y ocho pares de bases. Estas secuencias se conocen como secuencias de reconocimiento, dado que son reconocidas por enzimas de restricción específicas.

Las bacterias protegen a su ADN de sus propias enzimas de restricción añadiendo un grupo metilo (CH_3) a uno o más de los nucleótidos de las secuencias de reconocimiento de su ADN. Esta metilación, que ocurre durante la replicación del ADN, es llevada a cabo por enzimas especiales. Por ejemplo, una enzima de restricción de *E. coli*, llamada *EcoRI*, corta la molécula de ADN sólo en la secuencia GAATTC. Las células que producen *EcoRI* también producen una enzima metiladora específica que añade un grupo metilo a una de las adeninas (A) de la secuencia GAATTC, protegiendo así a su propio ADN del reconocimiento y la escisión. (Curtis y Barnes, 2001).

Como manifiesta Curtis y Barnes (2001), un segundo aspecto importante es que no todas hacen cortes rectos en ambas cadenas de la molécula de ADN (Figura 4.3). Algunas incluyendo la *EcoRI*, cortan las cadenas son algunos nucleótidos de diferencia, dejando extremos pegajosos, estos pueden volver a aparearse entre si cuando se forman espontáneamente puentes de hidrógeno entre bases complementarias.

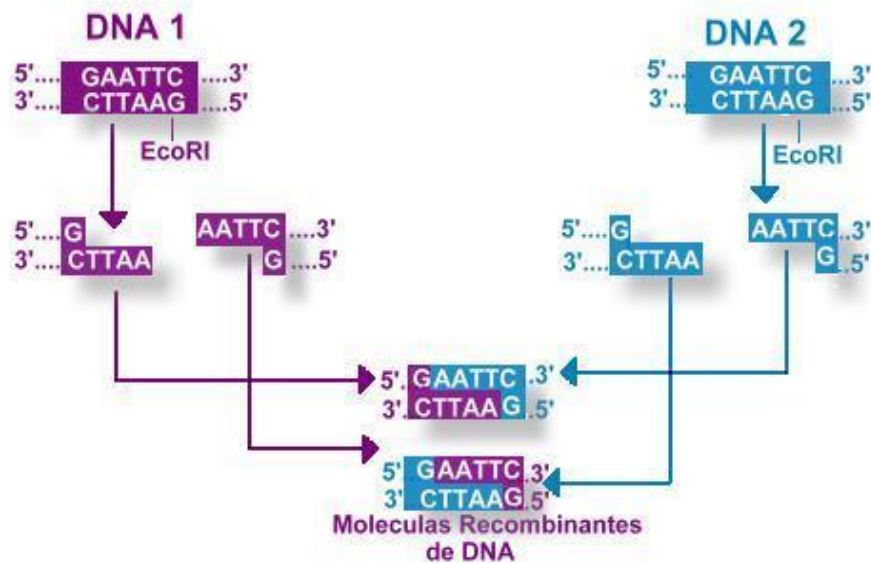


Fuente: Curtis y Barnes, 2001.

Figura 4.3. Las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción. Frecuentemente tienen seis pares de bases de longitud y, cuando se leen en la misma dirección (por ejemplo 5' a 3'), las dos cadenas complementarias de la secuencia son idénticas; estas secuencias se denominan secuencias palindrómicas. Algunas enzimas como *EcoRI* y *HindIII* escinden el ADN dando como resultado extremos pegajosos. Las enzimas de restricción generalmente se obtienen de bacterias y su nombre deriva del nombre científico de esas bacterias: *HpaI* es de *Hemophilus parainfluenzae*; *EcoRI* es de *E. coli* y *HindIII* es de *Hemophilus influenzae*.

Muchas de las enzimas de restricción cortan secuencias palindrómicas, lo cual significa que la secuencia de bases de una cadena se lee igual que su complemento

pero en sentido opuesto. (Así, el complemento de nuestro ejemplo, 5' –AAGCTT–3', se lee 3' –TTCGAA–5'). Al cortar del ADN ambas cadenas de manera asimétrica, estas enzimas producen fragmentos con extremos de cadena sencilla complementarios, que se denominan extremos adhesivos o extremos pegajosos (Figura 4.4) porque pueden parearse (por enlaces de hidrógeno) con los extremos monocatenarios complementarios de otras moléculas de ADN que han sido cortados por la misma enzima. (Solomon *et al.*, 2001).



Fuente: Muñoz (2004).

Figura 4.4. Unión entre fragmentos de ADN con extremos adhesivos o pegajosos, con la enzima de restricción *EcoRI*.

Las enzimas de restricción varían mucho en el número de bases de ADN que reconocen (Tabla 4.4), que va desde apenas 4 hasta 23 bases. (Solomon *et al.*, 2001). En una secuencia de ADN aleatoria hipotética se producirá una secuencia determinada de 4 bases, en promedio, una vez cada 4^4 (256) bases. Cada 6^4 (1396) bases aparecerá una secuencia de 6 bases (Smith y Wood, 1998), y mientras que un cortador de 6 bases produciría fragmentos con un promedio de 4^6 ó 4096 bases (Solomon *et al.*, 2001).

Tabla 4.4. Algunas endonucleasas de restricción y sus orígenes.

Enzima	Organismo	Sitio de reconocimiento
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	G - AATTC
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	A - AGCTT
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	G - ANTC

c. Tipos de Enzimas de Restricción

Existen 3 tipos de enzimas de restricción:

4) Tipo I

Una sola enzima (multimérica que posee 3 subunidades) reconoce la secuencia específica de ADN, metila y restringe. Pero la restricción no ocurre en el sitio de reconocimiento, sino que es al azar y en sitios distantes al de reconocimiento. (Herveg y Barcia-Macay, 2004).

5) Tipo II

Enzimas diferentes realizan la restricción y modificación. La restricción ocurre en el sitio de reconocimiento ó adyacente. Estas enzimas tipo II son las utilizadas en genética molecular puesto que permiten romper el ADN en sitios específicos, y así, recuperar secuencias conocidas (Herveg y Barcia-Macay, 2004). Rivera y Maldonado (2005), consideran las siguientes características de las enzimas Tipo II:

- Sólo tienen actividad de restricción.
- Cortan de manera consistente y predecible dentro de la secuencia que reconocen.
- Sólo requieren Mg^{++} como cofactor.
- No necesitan ATP.

6) Tipo III

Es similar al sistema tipo I, utilizan una enzima oligomérica que realiza todas las actividades enzimáticas, y rompen el ADN 25-27 pb, más allá del sitio de reconocimiento (Herveg y Barcia-Macay, 2004). Rivera y Maldonado (2005), consideran las siguientes características de las enzimas Tipo I y III:

- Tienen actividad de restricción (cortan) y modificación (metilan).
- Cortan a cierta distancia de la secuencia de reconocimiento, las Tipo I cortan lejos de la secuencia de reconocimiento, ya sea río arriba o río abajo. Las Tipo III cortan de 5-8 bases antes o después de la secuencia que reconocen.
- Necesitan Adenosin Tri Fosfato (ATP) para moverse a través de la molécula de ADN, desde el lugar de reconocimiento hasta el sitio del corte.

Cuadro 4.1. Comparación de los tipos de enzimas de restricción.

	TIPO I	TIPO II	TIPO III
Estructura	Multimérica (3)	R-M separadas	Dimérica
	400KDa	80KDa c/u	108 y 75KDa
Punto de corte	1000pb	0pb	20 – 25pb
Requerimientos:	SAM – ATP - Mg	Mg	ATP–Mg
Restricción		SAM	SAM – ATP – Mg
Modificación			
Secuencia	Asimétrica	Simétrica	Asimétrica
	Bipartita	Cont. o no	Continua

Fuente: Rocha y Bernal, 2001. Elaborado: Terán y Santillán, 2006

R-M: Restricción – Modificación.

d. Nomenclatura

Las endonucleasas se nombran a partir de las bacterias de las que son extraídas, su nombre está dado según el género y la especie de la bacteria de donde se aisló por primera vez esta enzima. La primera letra representa el género de la bacteria, las próximas dos indican la especie, una cuarta letra indica la cepa, y un número al final indica la cantidad de enzimas que se han aislado de esa cepa. Ej.: (Rivera y Maldonado, 2005).

Eco RI → E = género Escherichia

co = especie coli

R = cepa RV 13

I = primera endonucleasa aislada de esta cepa

e. Factores críticos a considerar

Para Rivera y Maldonado (2005), existen varios factores que son críticos al trabajar con enzimas de restricción y que pueden afectar la actividad de las mismas:

1) Pureza del ADN

La reacción de las enzimas es muy dependiente de la pureza, contaminantes como proteínas, fenol, cloroformo, etanol, EDTA, SDS, altas concentraciones de sal, etc. inhiben las endonucleasas.

2) Temperatura y pH

Las enzimas son muy sensitivas a temperatura y pH en lo que respecta a su estabilidad y actividad.

3) ADNsas

Las ADNsas degradan el ADN en presencia de Mg^{++} .

4) Contaminantes con carga (-)

Migración de contaminantes con molécula de ADN, ya que el ADN tiene carga negativa.

5) ADN contaminado con otro ADN

Varios sitios de reconocimiento no específicos

6) Grados de metilación

Algunas endonucleasas son inhibidas por metilación.

7) Tipo de molécula de DNA

Si el DNA no tiene la secuencia que es reconocida por la enzima accesible, esta no puede cortar el material genético (ej. si el DNA está súper enrollado el lugar de restricción no va a estar accesible para la enzima).

8) Buffer adecuado

Este provee el ambiente que necesita la enzima para trabajar en condiciones óptimas.

Importante: Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que se necesita para cortar 1µg de DNA en 1 hora. El buffer siempre debe añadirse como un 10% de la reacción total de digestión.

f. Aplicaciones de las Enzimas de Restricción.

Definitivamente las enzimas de restricción de mayor aplicación en biología molecular son las de Tipo II, en la disección del ADN y en la construcción de ADN

recombinante; sin ellas los rápidos avances de la genética molecular, en las últimas dos décadas, no habrían tenido lugar. Se han desarrollado y refinado metodologías con base en la restricción de genomas tal es el caso de RFLP's, AFLP's, clonación molecular, construcción de mapas genéticos. (Rocha y Bernal, 2001).

Adicionalmente Rivera y Maldonado (2005), nos amplían su aplicación:

- Hacer mapa de restricción de un plásmido o bacteriófago.
- Fragmentar DNA genómico para separación de electroforesis y “Southern Blot”.
- Generación de fragmentos para ser usados como sondas marcadas en “Southern” y “Northern blotting”.
- Generación de fragmentos para ser subclonados en los vectores apropiados, creación de ADN recombinante.

2. Electroforesis de ADN

a. Generalidades

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa (Berkelman y Stenstedt, 1998).

Mediante la técnica de electroforesis, es posible separar mezclas de determinadas macromoléculas, como polipéptidos o fragmentos de ADN o ARN por medio de electroforesis en gel, un método con el que se aprovecha que tales moléculas posean grupos cargados que las hacen migrar en un campo eléctrico (Solomon *et al.*, 2001).

Fue empleado por primera vez por en el año 1937, pero su importancia vino a incrementarse cuando en los años cincuenta E. L. Durrum y Arne W.K. Tiselius, impulsaron la electroforesis de zona, nombre que se asignó a la separación de materiales en

un campo eléctrico en presencia de algún tipo de soporte; aunque este término se limitó originalmente al análisis de coloides y partículas submicroscópicas, sin embargo se ha convertido en estos últimos años en una metodología aplicada a sustancias de bajo peso molecular (Berkelman y Stenstedt, 1998).

Los ácidos nucleicos ya disponen de una carga eléctrica negativa, que los dirigirá al polo positivo, mientras que las proteínas se cargan con sustancias como el SDS ([detergente](#)) que incorpora cargas negativas de una manera dependiente del peso molecular. Para la separación se usa un gel de agarosa o [poliacrilamida](#) (fibras cruzadas, como una malla). Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se moverán y deberán ir pasando por la malla, por la que las pequeñas se moverán mejor, más rápidamente. Así, las más pequeñas avanzarán más y las más grandes quedarán cerca del lugar de partida (Wikipedia, 2005).

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo).

El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone, por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominado difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión.

La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzarán a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el tiempo (Berkelman y Stenstedt, 1998).

Las micelas están cargadas de electricidad, lo que se puede demostrar introduciendo dos electrodos conectados a una fuente de corriente continua en una

dispersión coloidal, en cuyo caso las partículas se mueven según el signo de su carga, sea hacia el ánodo (anaforesis) o hacia el cátodo (cataforesis), originando un fenómeno conocido con el nombre de electroforesis. La velocidad de desplazamiento de las micelas, por unidad de intensidad del campo, es variable y depende de su carga y de la resistencia que le opone el disolvente.

El tipo de electroforesis que se utiliza para la separación de ácidos nucleicos es la electroforesis zonal. En ella se utilizan medios de soporte para crear zonas separadas en las que casi todas las moléculas de una mezcla pueden identificarse independientemente. Los medios de soporte más utilizados son los geles; estos se ponen en contacto o sumergen en una solución buffer que permite la conducción del campo eléctrico a lo largo de todo el sistema (Bernal, 2001).

Un gel es una red polimérica tridimensional a través de la cual migran las moléculas a separar. Los geles más utilizados para separación de ácidos nucleicos son la Agarosa y la Poliacrilamida (Bernal, 2001).

b. Métodos electroforéticos zonales

Son los más comunes, dada su alta aplicabilidad en diferentes campos. Son útiles para lograr la separación de mezclas complejas. Se aplican pequeñas cantidades de la disolución de proteínas a un soporte sólido, que se impregna con una solución tampón. Los soportes son en general polímeros y forman un gel poroso que restringe el movimiento de las moléculas a través del medio durante la electroforesis y disminuyen los flujos de convección del solvente.

Como soporte han sido utilizados papel (celulosa), almidón, poliacrilamida, agarosa y acetato de celulosa, entre otros. Este método tiene gran poder resolutivo por que se aplica una cantidad pequeña de proteína a una zona estrecha, mientras que la longitud del trayecto es mucho mayor que la zona de aplicación. El equipamiento requerido es simple, fuente de poder, cubeta vertical u horizontal donde se colocan el soporte y dos electrodos. Los más utilizados son:

4) Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida se forman por polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante un tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada en el tamaño del poro, lamentablemente cada vez se emplea menos en diagnóstico debido a su neurotoxicidad (Berkelman y Stenstedt, 1998).

La poliacrilamida es un polímero lineal extraído de Acrilamida y N.N'-metilenbisacrilamida y generalmente permite la separación de moléculas de entre 5 y 500pb. La polimerización se lleva a cabo químicamente con ayuda de un iniciador (Persulfato de Amonio) y un catalizador del entrecruzamiento (TEMED). Aunque la manipulación de los geles de poliacrilamida es compleja, son ideales para algunos procedimientos que requieren una alta resolución (separación de una base de diferencia) (Bernal, 2001).

5) Electroforesis en geles de agarosa.

La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) posee la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50° C y formar un gel, semisólido al enfriarse. Este gel está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas saturada de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas, se usa usualmente para separar moléculas grandes de alrededor 20.000 nucleótidos (Berkelman y Stenstedt, 1998).

Una molécula de ADN cortada con enzimas de restricción genera diferentes fragmentos. Estos pueden ser separados en base a su tamaño utilizando un gel de electroforesis. La agarosa es un polisacárido de galactosa y derivados de galactosa que se entrecruzan por puentes de hidrógeno. Se puede variar el tamaño de los poros ajustando la concentración de agarosa.

Los fragmentos de ADN migrarán a una razón inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño o peso molecular. A mayor tamaño menor será la migración del fragmento y a menor tamaño mayor será la migración del fragmento. El movimiento de los fragmentos de ADN va a producir un patrón de bandas, donde cada banda corresponde a un fragmento de un tamaño particular.

El tamaño de cada fragmento puede ser determinado utilizando un marcador o una escalera de ADN cuyos fragmentos tienen pesos moleculares conocidos. Este marcador sirve de control y migrará paralelo a las bandas de DNA que deseamos analizar.

Bajo condiciones fisiológicas los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos son ionizados y migrarán al electrodo positivo (ánodo) cuando se colocan en presencia de un campo eléctrico. La carga neta del ADN es negativa (por la presencia de los grupos fosfatos) lo que permite que migre del cátodo (electrodo negativo) al ánodo (electrodo positivo).

Las moléculas de ADN y ARN son en general demasiado grandes para que avancen a una velocidad razonable por estos geles, por lo que lo habitual es fragmentarlas antes de someterlas a electroforesis (Solomon *et al.*, 2001).

La agarosa cuyas disoluciones (típicamente de 0,5 a 2%) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de aprox. 50° C y formar un gel, semisólido, al enfriarse. Este gel está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas, embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas de ácido nucleico a su través, en mayor medida cuanto más grandes sean éstas.

Al preparar el gel enfriando la agarosa en un molde adecuado, se dejan en él unos huecos o pocillos para poder introducir luego en ellos la muestra, y que así ésta se vea obligada a introducirse en el seno del gel cuando se aplica el campo eléctrico. (Figura 4.5).



Fuente: <http://biomodel.uah.es/biomodel-misc/anim/elfo/electrof.html>

Figura 4.5. Molde del gel de agarosa.

6) Electroforesis capilar

La electroforesis capilar se basa en los mismos principios de las técnicas electroforéticas convencionales, pero utiliza condiciones y tecnologías diferentes que permiten obtener una serie de ventajas al respecto, Esta separación de péptidos es realizada sobre un capilar de sílica fundida a potenciales elevados de 20 a 30 Kv en un campo de 400 a 500 v/cm refrigerados estos capilares por aire.

La corriente electroosmótica (FEO) generada por los grupos silanol de la superficie interna del capilar da como resultado una corriente plana del frente del líquido que contrasta con el frente parabólico de la cromatografía líquida de alta resolución.

La ventaja de esta técnica es que el capilar de sílica fundida que generalmente se cubre con una capa de polimina para darle mayor rigidez y resistencia, tiene una ventaja a través de ella que permite el pasaje de la luz UV de tal manera que la visualización es “on-line”.

Con esta técnica descrita es posible separar cationes, aniones, proteínas, macromoléculas y sustancias no cargadas en forma simultánea (Berkelman y Stenstedt, 1998).

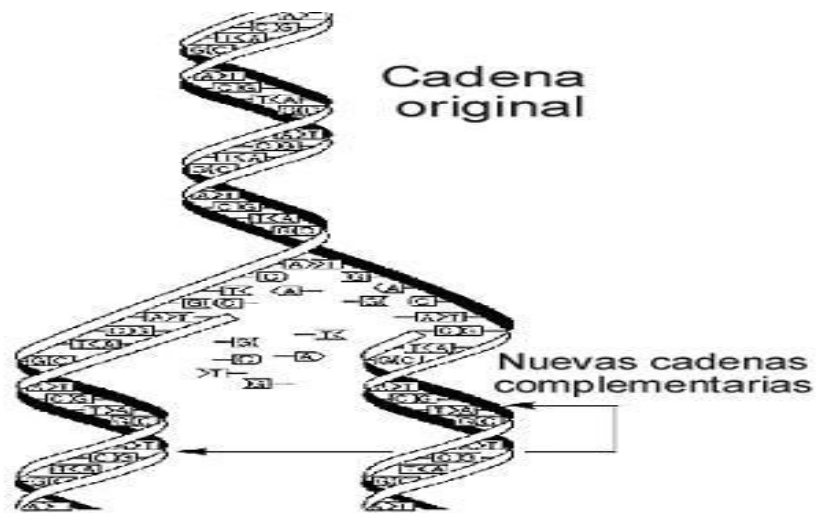
3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

a. Generalidades

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es un procedimiento rápido *in Vitro* para amplificar enzimáticamente segmentos específicos de ADN (Ausubel *et al.*, 1997) que utiliza ciclos de desnaturalización, apareamiento con cebadores (oligonucleótidos sintéticos) y extensión por una ADN polimerasa termoestable.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés, (Polymerase Chain Reaction) permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Esta técnica fue ideada en 1983-1989 por Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nóbel de Química en 1993 por dicho invento (Entrala, 2000).

Como su nombre lo indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente (Figura 4.6). Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés “primer”) (AMGEN, 2004).



Fuente: Ramírez *et al.*, 2006.

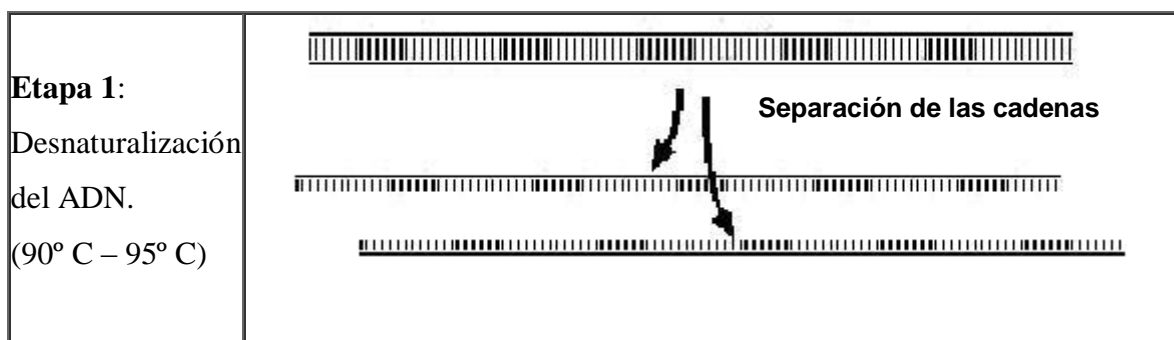
Figura 4.6. Partiendo de una cadena original de ADN, se obtiene nuevas cadenas complementarias.

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa*. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus aquáticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79° - 85° C). A esta temperatura dicha enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C. La temperatura optima a la que actúa la *Taq polimerasa* permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los “primers” y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los “primers” unidos inespecíficamente al ADN. (Entrala, 2000).

La amplificación de ADN se obtiene por ciclos repetidos de PCR, cada uno de los cuales consta de tres etapas o estadios de temperatura distintos.

b. Desnaturalización

Entrala (2000), manifiesta que para comenzar la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90° a 95° C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los “primers” y una posterior extensión (Figura 4.7).



Fuente: Ramírez *et al.*, 2006.

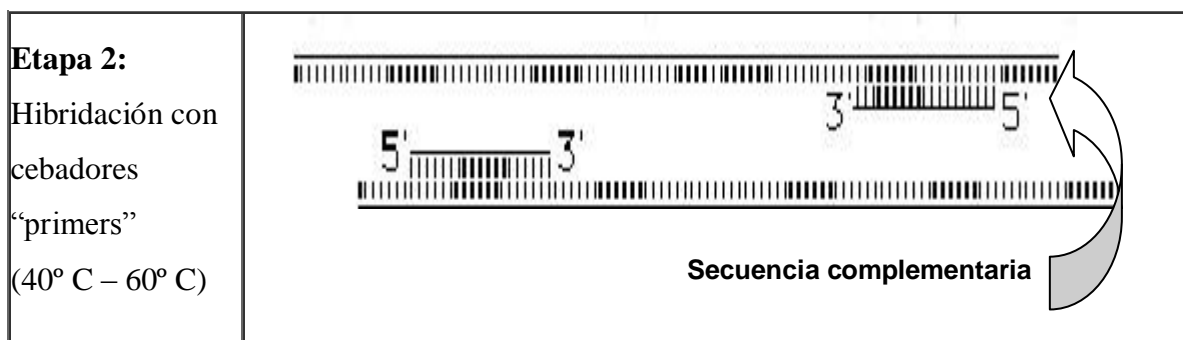
Figura 4. 7. Desnaturalización de la cadena de ADN. Por medio de la aplicación de calor a 90° C - 95° C, se produce la separación de las dos cadenas de la molécula de ADN que se desea amplificar. Al romperse los enlaces de hidrógeno, cada cadena actúa como molde para fabricar su complementaria.

c. Hibridación

Esta fase se denomina también fase de “annealing” o de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40° y los 60° C para que se pueda producir la unión de los “primers” a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o “annealing” (T_m , “melting temperature”) depende de varios factores y es

relativamente específica para cada “primer”. La longitud de los “primers” y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación, una fórmula simple para calcular la T_m es la siguiente: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$

No obstante, cada “primer” exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de “annealing” específica ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa (Figura 4.8) (Entrala, 2000).



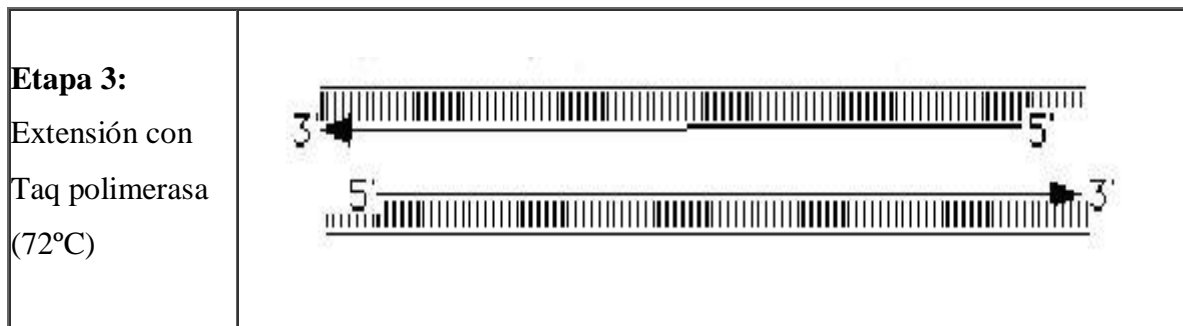
Fuente: Ramírez *et al.*, 2006.

Figura 4.8. Hibridación de los cebadores. La T° se disminuye rápidamente a 40° C – 60° C, para lograr que los cebadores o “primers” reconozcan sus secuencias complementarias en las cadenas de ADN correspondientes y se unan con ellas. Los “primers” no deben ser complementarios entre sí y deben corresponder a los extremos del fragmento del ADN que se quiere amplificar.

d. Extensión

Durante este paso la *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3’ del “primer” utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72° C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb.

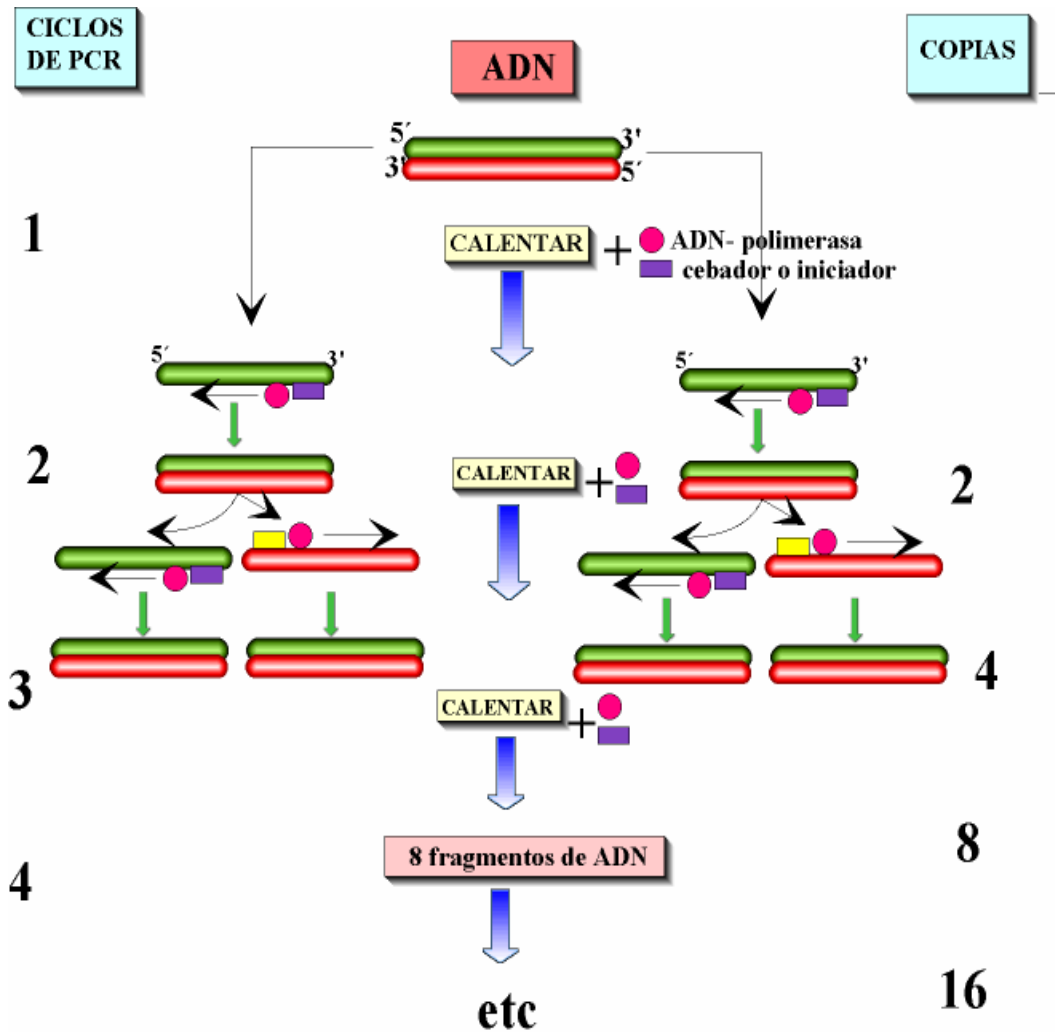
Un factor importante en el transcurso de las diferentes fases es el tiempo de rampa. Este se define como el tiempo invertido en pasar de una temperatura a otra y depende del diseño y de las características del aparato donde se realiza automáticamente este proceso, el termociclador. En las nuevas generaciones de termocicladores este factor se ha ido optimizando para hacerlo mínimo (Figura 4.9) (Entrala, 2000).



Fuente: Ramírez *et al.*, 2006.

Figura 4.9. Extensión con Taq polimerasa. La T° se eleva a 72° C, con lo que la taq polimerasa agrega los diferentes nucleótidos complementarios siguiendo el orden de la cadena que sirve de molde.

Proceso completo de amplificación de ADN utilizando la técnica de PCR. El proceso se repite un número determinado de veces o ciclos, generalmente 30, y se consigue un aumento o amplificación exponencial del número de copias del fragmento de ADN que sirvió como molde. (1, 2, 3,4) como se observa en la Figura 4.10.



Fuente: Arrkis, 2004.

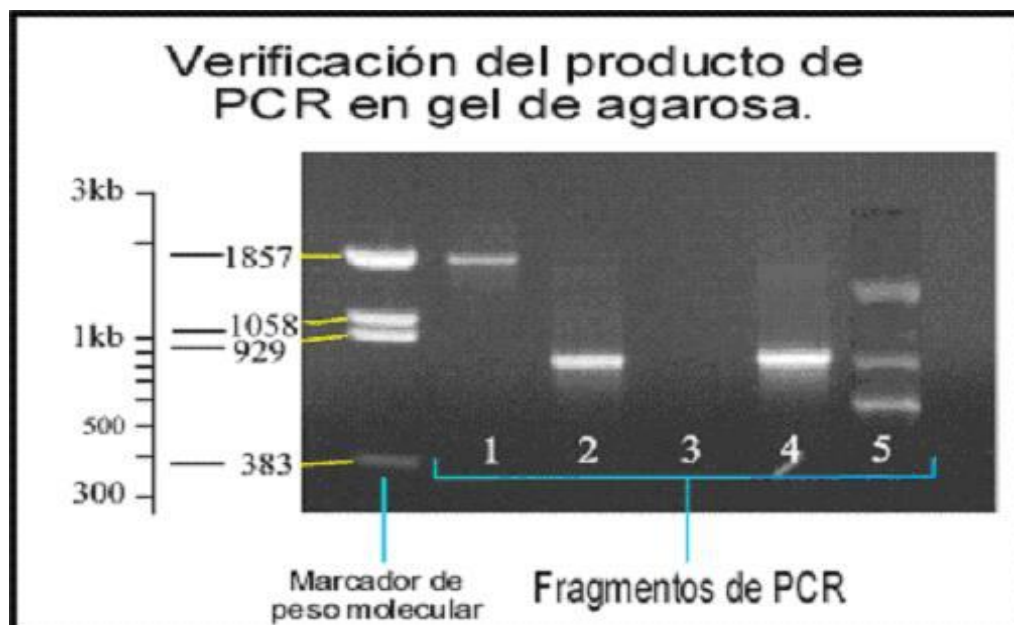
Figura 4.10. Proceso completo de amplificación de ADN.

Una ventaja de la técnica es que amplifica únicamente el fragmento de ADN que queremos, aunque esté en cantidades mínimas (alta sensibilidad) o en presencia de grandes cantidades de ADN semejantes (alta especificidad). La reacción es eficaz incluso si se parte de muestras de ADN muy poco purificadas, es decir, que se encuentran en presencia de otros componentes (Ramírez *et al.*, 2006).

Una vez amplificada la molécula del ADN que se desea, se coloca la muestra en gel de agarosa, en el que se agrega “buffer juice” para que nos permita

visualizar cómo la muestra corre a través del gel, para lo que se emplea corriente eléctrica a 120 V, durante 30 a 40 minutos (Ramírez *et al.*, 2006).

De acuerdo con el tamaño de la molécula de ADN, será la distancia que correrá en el gel; posteriormente este se tiñe con bromuro de etidio que permite visualizar la extensión en forma de bandas con el empleo de luz ultravioleta. La banda obtenida se compara con un marcador de peso molecular para poder establecer su tamaño y así verificar si corresponde al fragmento que se busca o se puede correr al mismo tiempo un control conocido y establecer comparaciones entre ambas bandas (Figura 4.11).



Fuente: Ramírez *et al.*, 2006.

Figura 4.11. Migración en gel de los pares de bases de una molécula de ADN amplificada.

e. Componentes de la PCR

7) Buffer de amplificación

Los buffer de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y $MgCl_2$. El $MgCl_2$ es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la

reacción ya que los iones Mg^{2+} son necesarios para la actividad, rendimiento y especificidad de la *Taq polimerasa*, es decir, actúan como cofactores (coenzima) de la polimerasa (Rodríguez, 2000).

La concentración óptima de $MgCl_2$ está en torno a 1,5 mM si se emplean concentraciones de 200 mM de cada uno de los dNTPs. No obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg ya que un exceso del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación (Entrala, 2000).

8) “Primers”

Para Rodríguez (2000), a la hora de elegir unos “primers” para amplificar un determinado fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir:

La longitud de cada uno de los “primers” debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que se ha comprobado que “primers” de mayor longitud (30-35 bases) no aumentan el rendimiento y los “primers” cortos carecen de suficiente especificidad.

Ambos “primers” deben tener una **T_m** similar (como mucho la diferencia entre ambas temperatura debe ser de +/- 5° C).

La relación bases púricas - bases pirimidínicas debe ser 1:1 (o como mucho 40-60%) una con respecto a la otra.

La secuencia de los “primers” debe comenzar y terminar con 1-2 bases púricas.

Para evitar la formación de dímeros de “primers” es necesario comprobar que los primers no contengan secuencias complementarias entre sí (Entrala, 2000).

Estudios realizados por Entrala (2000) muestran que los dímeros de “primers” consisten en fragmentos de doble cadena cuya longitud es muy próxima a la de la suma de los “primers” y se producen cuando un “primer” es extendido a continuación del otro. El mecanismo exacto por el que se forman estos dímeros no está completamente determinado. La observación de que “primers” con los extremos 3’ complementarios favorecen su formación sugiere que el paso inicial se debe a interacciones transitorias que aproximan los extremos complementarios. Algunas polimerasas, incluida la *Taq*, han mostrado una débil actividad polimerizadora no dirigida por un ADN patrón, la cual puede unir nucleótidos adicionales al doble extremo apareado. Si esta actividad puede producirse sobre una hebra sencilla de oligonucleótidos, resultaría una buena oportunidad para que la extensión formara un corto solapamiento en el extremo 3’ con el otro “primer”, suficiente para promover la formación del dímero.

9) Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs)

Las concentraciones de dNTPs que suelen usarse están en torno a 200 μM para cada uno de ellos. En un volumen de reacción de 25 μl con esta concentración de dNTPs se sintetizarían entre 6-6.5 μg de ADN. La concentración de dNTPs y de MgCl_2 va relacionadas ya que el Mg se une a los dNTPs con lo que concentraciones elevadas de dNTPs inhibirían la reacción al no tener la *Taq polimerasa* suficiente Mg como para incorporar dNTPs. Para una concentración de 200 μM de cada dNTP se suele añadir MgCl_2 a una concentración de 1,5 Mm (Entrala, 2000).

10) Taq Polimerasa

Las cantidades óptimas de *Taq polimerasa* necesarias para la síntesis de ADN están alrededor de 2 unidades en 25 μl de volumen final de reacción. La actividad de esta enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg^{2+} y de algunos iones monovalentes de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad (Rodríguez, 2000).

Estudios realizados por Entrala (2000) muestran que pequeñas concentraciones de KCl estimulan la actividad sintética de la *Taq* en un 50-60% con un

máximo aparente cuando su concentración es de 50 mM. Existen algunos datos relacionados con la influencia de ciertos reactivos que se emplean antes de la amplificación y que alteran la actividad de la *Taq*. Por ejemplo concentraciones 1M de urea estimulan la actividad, el SDS a bajas concentraciones que la inhibe al igual que concentraciones mayores del 10% de etanol.

11) ADN molde o “Template”

Es el ADN del cual queremos copiar un determinado fragmento, es, por tanto, el ADN que la *Taq polimerasa* utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas. La cantidad de ADN necesaria para la PCR depende de varios factores:

Del marcador que se va a amplificar: hay marcadores cuyos “primers” son más específicos o bien cuyas condiciones de amplificación están mejor optimizadas que las de otros. Por esta razón puede darse el caso de que cierta cantidad de ADN (sobre todo cuando jugamos con cantidades mínimas) amplifique para unos marcadores pero no para otros (Rodríguez, 2000). Para Entrala (2000) cuando en un laboratorio se va a utilizar un nuevo marcador es necesario hacer un estudio de validación en él que se incluye un estudio de sensibilidad. De dicho estudio de sensibilidad puede sacarse como conclusión cuál es la mínima cantidad de ADN que amplifica en condiciones estándar.

Calidad del ADN: Cuando se trabaja con ADN cuya calidad es óptima no suele haber problemas en la amplificación y cantidades del mismo por encima e incluso por debajo de los 5 ng rinden buenos resultados. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque esté degradado o bien porque dicho ADN esté ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa (Rodríguez, 2000; Entrala, 2000). Si el ADN está degradado por la acción de enzimas de restricción el que obtengamos o no resultado en la amplificación va a depender de que el fragmento a amplificar haya sido dañado o no (Entrala, 2000).

En el caso en el que tengamos ADN sin degradar pero unido a una serie de contaminantes habría que intentar diluir al máximo la muestra para disminuir dichos

contaminantes, pero siempre dentro de un rango de ADN que no esté por debajo del límite de sensibilidad de la PCR (Entrala, 2000).

12) Adyuvantes de la PCR

Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. Aunque algunos autores han recomendado el uso del DMSO y del glicerol, el adyuvante más extendido y utilizado es el BSA a concentraciones por encima de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ el BSA incrementa la eficiencia de la PCR ya que actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la *Taq polimerasa* (Rodríguez, 2000; Entrala, 2000).

Para Entrala (2000) la PCR ofrece una serie de ventajas, frente al uso de las técnicas de análisis genético utilizadas con anterioridad, como son:

- Su capacidad para obtener resultados en casos en los que la cantidad de ADN es mínima o en casos en los que el ADN esté parcialmente degradado.
- Genera en un espacio corto de tiempo un elevado número de copias de la secuencia de ADN que es objeto de estudio, lo cual permite utilizar técnicas de visualización más sencillas y rápidas que el uso de sondas marcadas radiactivamente.
- Permite la determinación y agrupación alélica en clases discretas, lo que facilita la elaboración de bases de datos, al hacer la estandarización inmediata y posibilitar la aplicación de métodos bioestadísticos y programas elaborados.

El uso de marcadores microsatélites de pequeño peso molecular aumenta las probabilidades de obtener resultados positivos de amplificación cuando el ADN se encuentra degradado ya que puede ser que dichos fragmentos no hayan sido digeridos (Entrala, 2000).

Para AMGEN (2004) la sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Por otra parte para solventar el problema de la cuantificación se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa.

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia (“quencher”), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del “quencher” y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

La técnica de la PCR ha sido vital para la secuenciación del genoma humano, así como de todos los otros genomas secuenciados hasta el momento. Además, actualmente existen muchas versiones comerciales de test basados en PCR para detectar agentes infecciosos como *Chlamydia trachomatis*, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que causa el SIDA, *Mycobacterium tuberculosis*, y otros muchos. El desarrollo de esta tecnología está siendo aplicado también en la exploración de enfermedades genéticas (ej. la anemia de células falciformes o la fibrosis quística), en pruebas para el cáncer (ej. para detectar recaídas tempranas), y para determinar si dos individuos son compatibles genéticamente de cara a un trasplante. La llegada de la PCR

cuantitativa promete un gran avance en estos test clínicos y de diagnóstico (AMGEN, 2004).

4. RLFP's (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción).

a. Generalidades

Es una técnica desarrollada a finales de los 70, se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular (por digestión con la misma enzima de restricción) en diferentes organismos. Los fragmentos más fáciles de analizar son los pequeños derivados de la digestión del genoma de las mitocondrias o los cloroplastos, puesto que las deleciones, sustituciones o mutaciones pueden alterar significativamente el patrón de bandas identificable por electroforesis en geles de agarosa, donde migran de acuerdo con su peso molecular. En cambio, para moléculas de ADN de mayor tamaño, como el ADN cromosómico, el patrón de bandas es tan complejo que es necesario utilizar sondas específicas para visualizar sólo ciertos fragmentos mediante la técnica de "Southern Blot" (Díaz, 2005).

b. PCR - RFLP

Las sondas de ADN para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque a veces se usan ADN preparados a partir de amplificaciones inespecíficas. Aunque la RFLP evalúa solo un tipo de polimorfismo en cada ensayo, el resultado es muy preciso. Los primeros mapas genómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la frecuencia de entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica. Cuando se emplea la PCR en lugar de sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos, se le denomina PCR-RFLP (Díaz G., 2005).

El estudio de los polimorfismos de este tipo consiste en el análisis en cuanto a número y tamaño de los fragmentos de ADN al ser digeridos con distintas enzimas de restricción. Los patrones de bandas resultantes se generan por la presencia o ausencia de los sitios de corte de la enzima producidos por mutaciones, deleciones o inserciones. Por lo tanto, la variabilidad está dada por las distintas tallas de los fragmentos que se originan

al digerir con las mencionadas enzimas el material genómico o un fragmento amplificado del genoma, de manera que un sitio de restricción polimórfico o una delección o inserción entre dos sitios de corte será detectado como un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción generados a nivel fenotípico Botstein *et al.*, (1980). La identificación de estos polimorfismos puede hacerse por “Southern Blot” o por PCR Levéziel *et al.* (1988). Este método se ha empleado en la caracterización de los genes de algunas de las proteínas lácteas bovinas Rodellar *et al.*, (1992); Osta (1994), citados por Díaz (2005).

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron muestras de sangre de la vena caudal de animales, de la Hacienda ESPE “San Antonio” ubicada en la vía Santo Domingo – Quevedo Km. 36, en el cantón Santo Domingo de los Colorados provincia de Pichincha. La primera toma de muestras se realizó el 30 de marzo del 2006, a 47 animales del hato de leche; la segunda se realizó el 19 de abril del 2006, a 15 animales de la raza Brahaman del hato de carne. Con las 62 muestras se procedió a la estandarización de los protocolos y una vez optimizada la técnica se realizó una tercera extracción el 5 de septiembre del 2006, a un grupo seleccionado de 34 animales para correlacionar los datos de producción y genotipos encontrados.

El análisis molecular se realizó en el Laboratorio de la Carrera de Biotecnología de la ESPE en Sangolquí, empleando los siguientes materiales y métodos, descritos a continuación:

C. MATERIALES

- Agitador (Thermolyne, CIMEREC® 2)
- Autoclave (MARKET FORGE)
- Balanza analítica (Mono bloc, AB 104-S, METTLER)
- Baño Maria de recirculación (JULABO 19)
- Cabina de flujo laminar Duplex (CSB-120, Control de Contaminación Ltda.)
- Cámara de electroforesis horizontal de geles, con accesorios (MGU-402 T, CBS SCIENTIFIC CO).
- Equipo de purificación de H₂O (MILLIPORE)
- Espectrofotómetro (UV-VIS Dual Beam, Labomed INC)
- Estufa (PRECISION)
- Fuente de Poder, para cámara de electroforesis (4000 P, THERMO)
- Guantes de látex
- Material de vidrio
- Microcentrífuga (M-24, BOECO)
- Microondas

- Micropipetas tipo Eppendorf Reference, P10, P20, P100, P1000
- pHímetro (THERMO)
- Recipientes de plástico para descarte de líquidos, y estantes para soporte de tubos.
- Refrigerador (freezers de -20°C y -70°C , máquina de hielo)
- Termo bloque (Digital Dry Bath Incubator, DAIGGER)
- Termociclador (TECHNE TC-512 2003)
- Termociclador (TECHNE Progene 1999)
- Transiluminador de luz ultravioleta (LM-20E, UVP UPLAND CA), con cámara incorporada (CANON)
- Transiluminador de luz ultravioleta (TFX-20M, VILBER LOURMAT)
- Tubos estériles de 0,2 ml de pared delgada, para PCR.
- Tubos estériles eppendorf (2 ml, para microcentrífuga.)
- Vortex (VX 100, LABNET)

REACTIVOS

(Ver ANEXO C para detalles)

- Ácido Bórico
- Agarosa
- Agua desionizada
- Agua grado PCR
- Bromuro de etidio
- Cebadores (Primers), ver ANEXO E
- Cloruro de Sodio, NaCl
- Cloruro de Potasio, KCl
- EDTA
- Etanol
- Glicerol
- Hidróxido de Sodio, NaOH
- Isopropanol
- Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit
- Marcador de 1Kb Ladder

- Marcador de 100 pb Ladder
- Marcador de 50 pb Ladder
- Marcador Low Mass Ladder
- Proteínasa K
- Taq DNA polimerasa, recombinante
- Tris Base
- Tris-HCl
- Tritón X-100

D. MÉTODOS

6. Animales

En la Hacienda ESPE “San Antonio” desde 1993, se da un impulso a la ganadería de leche; el técnico responsable fue el Ing. Manuel Fuentes, quien parte de una producción de 23.000 litros año, logrando un incremento al 2006 de 400.000 litros de leche año. El hato esta compuesto por varias razas y cruces (Sahiwual-Holstein-Lucerna-Gyr-Brown Swiss, entre otras).

La selección se la realizó en el campo con el técnico responsable (Foto 5.1), seleccionando 34 animales (Foto 5.2), considerados como Unidades de Muestreo (UM) para correlacionar los datos de producción y de esta manera cumplir los objetivos de la presente investigación.



Foto 5.1. Actividad de campo para la selección de las Unidades de Muestreo en la Hacienda ESPE “San Antonio”.



Foto 5.2. Animal seleccionado para el proyecto de investigación.

7. Obtención del material genético

Se colectaron muestras de la sangre periférica de la vena caudal (Foto 5.3), en tubos vacutainer con capacidad de 5 ml de sangre, con 500mM EDTA como anticoagulante, posteriormente para el transporte de las muestras se colocaron en recipientes para mantenerlas en frío (Foto 5.4), en el laboratorio se congeló a -20°C para conservarlas hasta su uso. De esta forma se obtuvo el material de partida para la extracción del material genético (ADN) de todos los animales (UM) en estudio.



Foto 5.3. Extracción de sangre de la vena caudal bovina.



Foto 5.4. Las muestras son colocadas en recipientes para mantenerlas en frío.

a. Extracción de ADN partiendo de sangre periférica

La extracción de ADN a partir de sangre periférica se realizó por tres (3) métodos, dirigida a obtener ADN para ser utilizado como molde en reacciones de PCR. La preparación de las soluciones stock se encuentran en el ANEXO D. Los métodos se describen a continuación:

1) Protocolo de Osta (1994) citado por Uffo (2000).

Se partió de 200 μ l de sangre periférica y se realizó lavados con solución NE 10x (10M NaCl, 10M EDTA), hasta que en la muestra no queden restos de hemoglobina (sobrenadante claro); después de cada lavado se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante dos minutos y se eliminó el sobrenadante, quedando los leucocitos (glóbulos blancos) en el precipitado.

La digestión de las muestras se realizó con 400 µl de solución PK2 (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% Tritón X-100, 200µg/ml proteinasa K), durante 1 hora a 56° C. Se agitó suavemente y se mantuvo media hora más en incubación a la misma temperatura. Posteriormente se inactivó la enzima, incubando la muestra a 99° C por 15 minutos y se conservó a 4° C hasta su uso.

2) Protocolo de Uffo (2000). Modificado en este estudio.

Este protocolo de extracción de ADN se basa en el método descrito por Uffo (2000), con algunas modificaciones de los protocolos que se utiliza en el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Carrera de Biotecnología de la ESPE, Sangolquí.

Se partió de 300µl de sangre periférica colocados en un tubo eppendorf (Foto 5.5), añadiendo 1 ml de la solución NE 10X (10M NaCl, 10M EDTA), para lavar las muestras (Foto 5.6), posteriormente se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante dos minutos para eliminar el sobrenadante (Foto 5.7), quedando los leucocitos (glóbulos blancos, pellet) en el precipitado (Figura 5.1).

Nuevamente se tomó 300 µl de sangre periférica en el mismo tubo eppendorf, y se añadió 1 ml de la solución NE 10X, para los lavados respectivos, centrifugando las muestras a 13.000 rpm durante dos minutos y eliminando el sobrenadante, quedando los leucocitos (pellet + pellet) en el precipitado. Se repitió los lavados hasta que en las muestras no se observen restos de hemoglobina y se obtenga un sobrenadante claro.



Foto 5.5. Colocar 300 μ l de sangre bovina en un tubo eppendorf.



Foto 5.6. Lavados con 1 ml de solución NE 10X.



Foto 5.7. Centrifugación de muestras a 13.000 rpm.

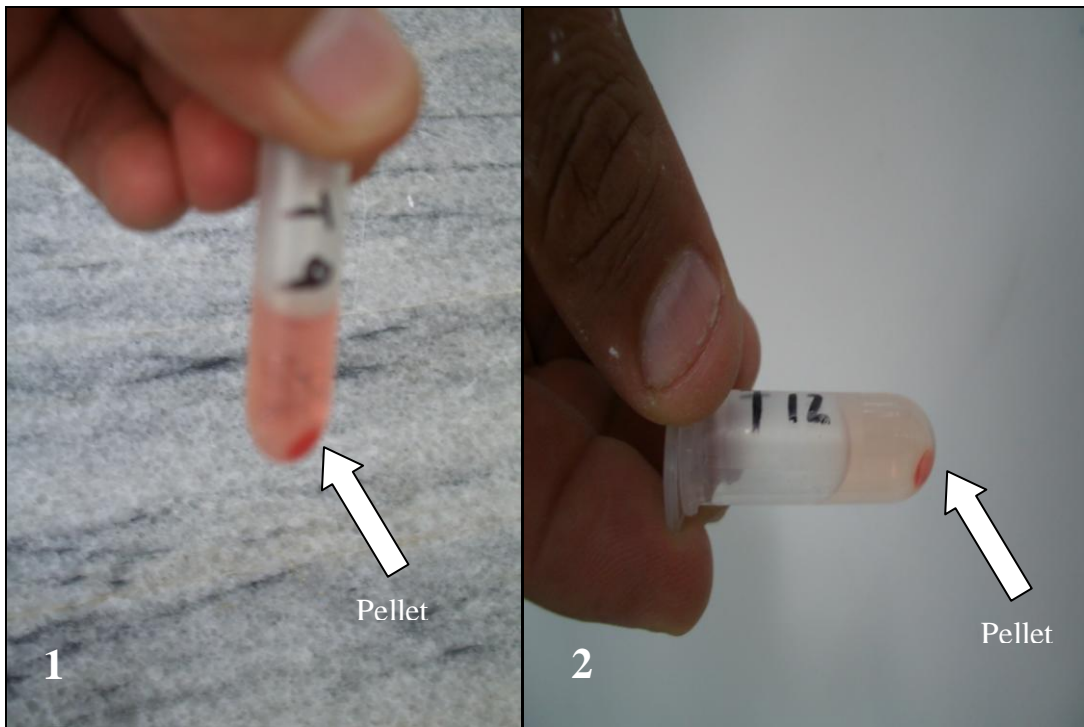


Figura 5.1. En 1 y 2 se observa el sobrenadante claro quedando los leucocitos (glóbulos blancos) en el pellet.

La digestión de las muestras se realizó con 200 μ l de solución PK2 (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% Tritón X-100, 200 μ g/ml proteinasa K) (Foto 5.8), durante 1 hora a 56° C. Se agitó suavemente y se mantuvo media hora más en incubación a la misma temperatura. Posteriormente se inactivo la enzima, incubando la muestra a 99° C por 15 minutos (Foto 5.9) y se conservo a 4° C hasta su uso.



Foto 5.8. Digestión con solución PK2, para ruptura de leucocitos y precipitación de proteínas.



Foto 5.9. Incubación de las muestras a 56° C, para liberar el ADN bovino.

3) Protocolo Extracción Kit Wizard Promega.

Se partió de un volumen de 300 µl de sangre periférica, utilizando los componentes del Kit Wizard (Foto 5.10), se agregó 900 µl de solución de lisis de células, y se agitó la mezcla de 3 a 5 veces. Posteriormente se incubó la solución a temperatura ambiente por 10 minutos y removiendo la mezcla de 2 a 3 veces.

Para la lisis de glóbulos rojos, se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm por 20 segundos a temperatura ambiente, hasta observar el sobrenadante de un color claro transparente. Se dio vortex a los eppendorf que contenían el pellet de 10 a 15 segundos, y se añadió 300 µl de solución de Lisis Nuclei, pipeteando de 5 a 6 veces con el fin de romper el pellet o la pared de los leucocitos, las soluciones se mostraron muy viscosas, pero se observó que no existía aglutinación.

En caso de la no ruptura total de glóbulos rojos, al no desaparecer la aglutinación por más de 1 hora, se añadió 100 µl adicionales de la solución Lisis Nuclei, y se incubó a 37° C hasta que desapareció la aglutinación.



Foto 5.10. Kit Wizard Promega, para la extracción de ADN bovino.

Posteriormente se añadió 100 µl de solución precipitadora de proteína, para lisis del núcleo (Foto 5.11) y se dio vortex de 10 a 20 seg. Se centrifugaron las muestras a 13000 rpm. por 3 minutos a temperatura ambiente, y se transfirió el sobrenadante a nuevos eppendorfs que contenían 300 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Suavemente se mezclaron las soluciones hasta que se pudo observar la medusa de ADN, de manera que se centrifugaron las muestras a 13000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente hasta que se observó el pellet de ADN blanco pequeño en las paredes de los eppendorfs. Una vez observado el pellet de ADN, se eliminó el sobrenadante y se añadió etanol al 70% (Foto 5.12) invirtiendo los tubos para lavar la medusa de ADN y se centrifugó de la misma manera que el paso anterior.



Foto 5.11. Solución precipitadora de proteína, del Kit Promega.

Se eliminó el etanol con pipeta pasteur, teniendo cuidado de no tomar el ADN, para invertir los tubos sobre papel y dejar secar al ambiente de 10 a 15 minutos. Una vez secos los eppendorfs se añadió 100 µl de solución rehidratante de DNA y se incubaron las muestras por 1 hora a 65° C (Foto 5.13), mezclando suavemente la solución para finalmente conservar el ADN de las muestras a una temperatura de 2° a 8° C.



Foto 5.12. Añadir Etanol al 70%, para lavar medusa de ADN.



Foto 5.13. Incubación de las muestras por 1 hora a 65° C, para rehidratar el ADN bovino.

8. Preparación de geles de agarosa

Para la preparación de los geles de agarosa, se tomó en consideración la concentración del gel a preparar en 60 ml de solución tampón, que es la capacidad de la bandeja que se utilizó (Foto 5.14); según sean los casos; para cuantificación se preparó un gel al 0,8%, para el caso de la visualización de los productos amplificados se preparó un gel al 2%, mientras que para la visualización de las variantes alélicas con la enzima de restricción, se preparó un gel al 3%. De igual forma se consideró los tiempos de corrida de electroforesis, los cuales fueron de 45 minutos, 30 minutos y 1 hora respectivamente.

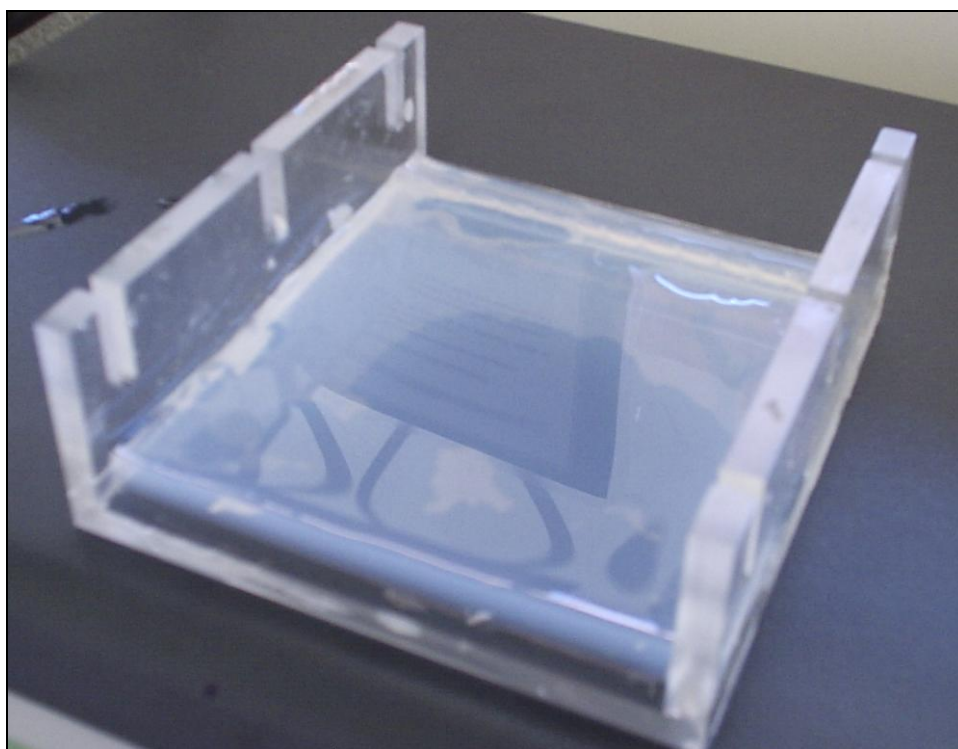


Foto 5.14. Bandeja molde para electroforesis.

Se preparó una solución stock de la solución tampón, como es el caso del TAE 5X, el mismo que mediante la dilución correspondiente se obtuvo la concentración final de TAE 1X, el cual sirve para la elaboración y polimerización de los geles de agarosa, y como medio propicio para que ocurra la migración de las moléculas (ADN) en la cámara electroforética.

En la elaboración de los geles de agarosa, se utilizaron cantidades de 0,48 g de agarosa, para obtener una concentración de 0,8%. Mientras que para el gel correspondiente a la visualización de los productos de PCR, la cantidad a pesar de agarosa fue de 1,2 g para obtener la concentración del 2%. Y para la preparación de los geles de agarosa al 3% de concentración, para la visualización de las variantes alélicas del gen, se pesó una cantidad de agarosa correspondiente a 1,8 g.

La cantidad de TAE 1X para la cámara de electroforesis fue de 500 ml, y para la bandeja fue de 60 ml más el 10% de la capacidad (en este caso 6 ml) total fue de 66 ml; el cual requiere para la preparación del gel de agarosa de tres ciclos, que comienza con la agitación necesaria para la hidratación de la agarosa en el tampón por el lapso de 5 minutos, seguido de un calentamiento en un horno microondas por 30 segundos para la dilución de la agarosa (Foto 5.15), otro ciclo de agitación por 5 minutos más, seguido de un calentamiento por 30 segundos; y se observa que la solución se aclara.



Foto 5.15. Agitación y calentamiento para la dilución de agarosa.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente, para aplicar 3 ml de bromuro de etidio (Foto 5.16) (concentración de 0,5 μ l por cada 10ml de TAE 1X).

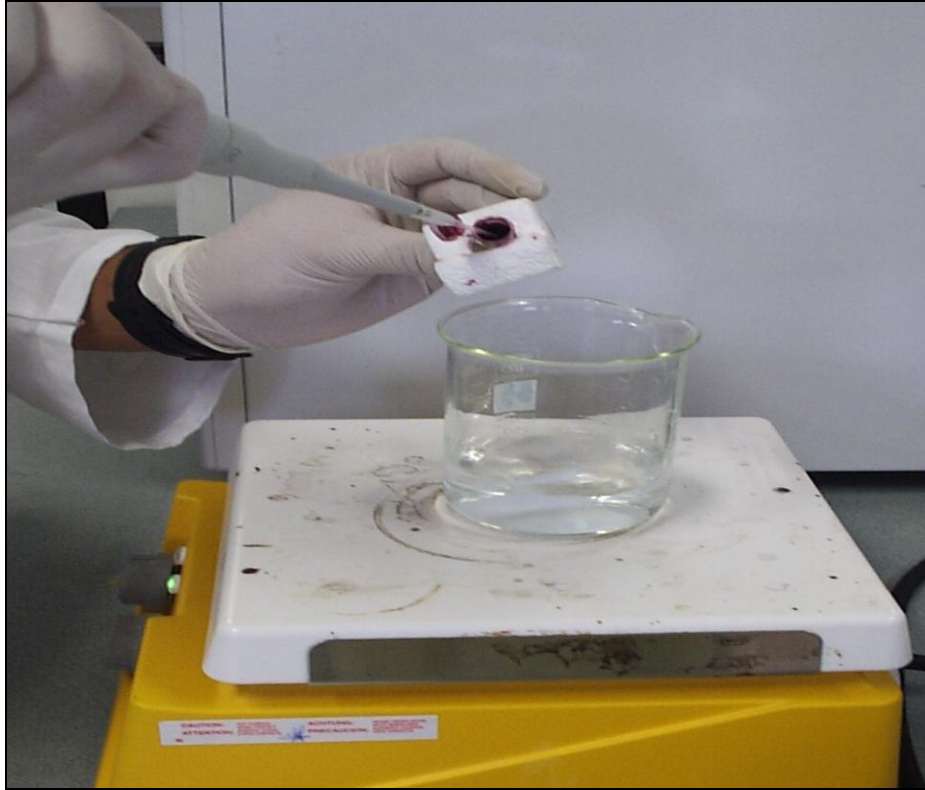


Foto 5.16. Aplicación de Bromuro de etidio en la dilución del gel de agarosa.

Se escogió el peine que se va utilizar (12 ó 18 posillos) y se vertió la dilución de agarosa en la bandeja molde, se dejó en reposo a temperatura ambiente por un período de 20 minutos que tarda la polimerización de la agarosa. (Foto 5.17).

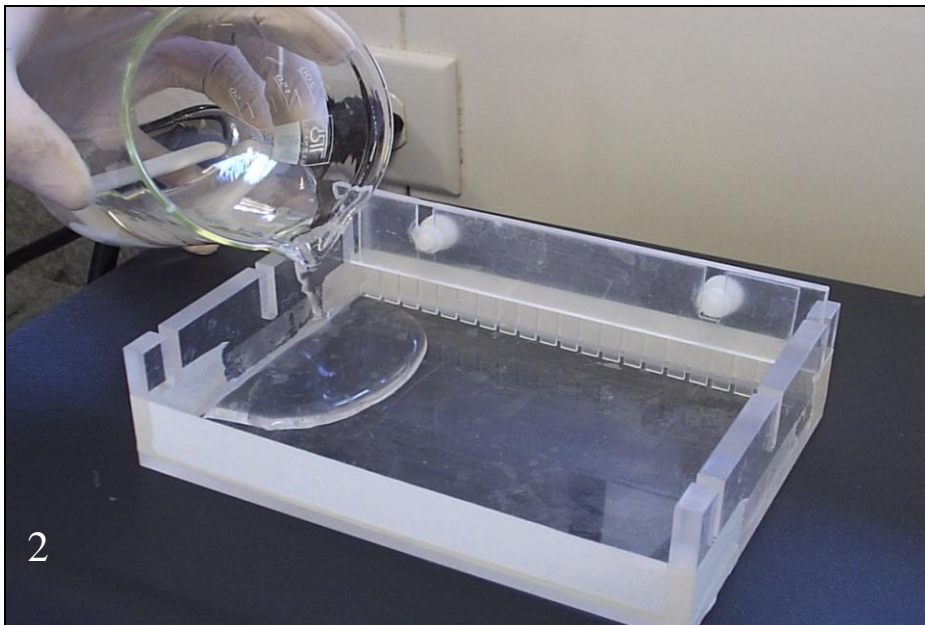
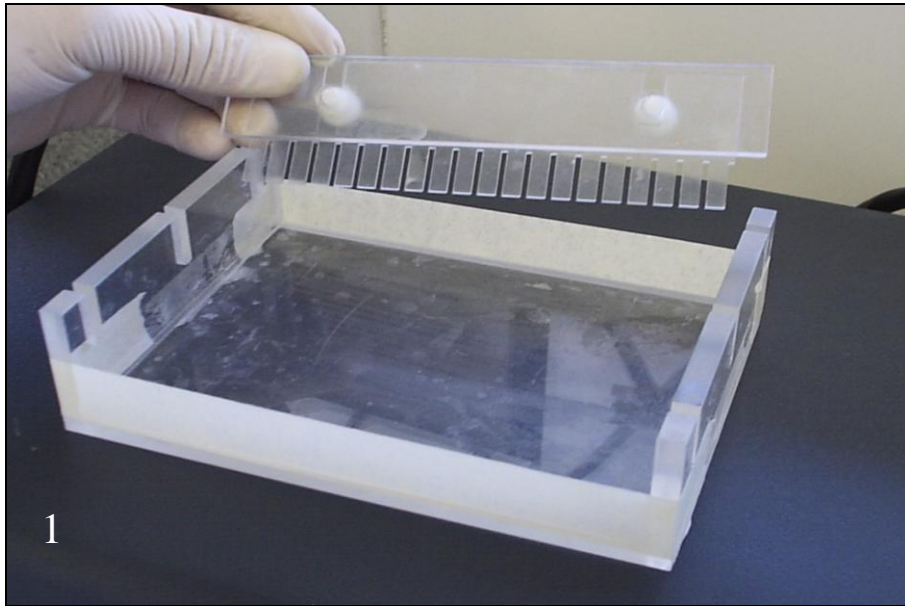


Foto 5.17. En 1 se escogió el peine a utilizar, en 2 se vertió la dilución de agarosa en la bandeja molde para la polimerización del gel de agarosa, después de 20 minutos.

Una vez polimerizado el gel se colocó la bandeja en la cámara de electroforesis y se procedió a preparar la muestra de ADN (Foto 5.18) y cargar con un buffer juice (azul de bromofenol), que es un colorante de peso molecular conocido que indica la progresión de las muestras en el gel (Foto 5.19).



Foto 5.18. Preparación de la muestra de ADN bovino.

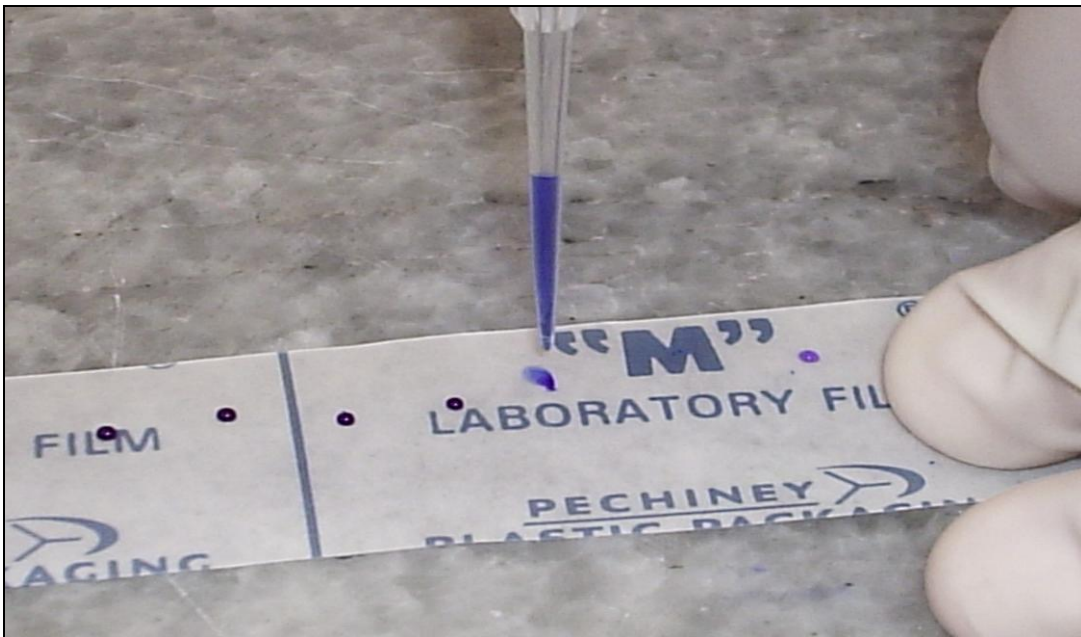


Foto 5.19. Mezcla buffer juice (bromo fenol) y ADN bovino.

En los pocillos se reserva el primero ó el último para un marcador molecular de peso conocido, que va a servir de referencia para conocer el tamaño de las muestras; así mismo los pocillos para los controles negativos y positivos que permitirá identificar posibles contaminaciones y el funcionamiento de la reacción (Foto 5.20 y 5.21).

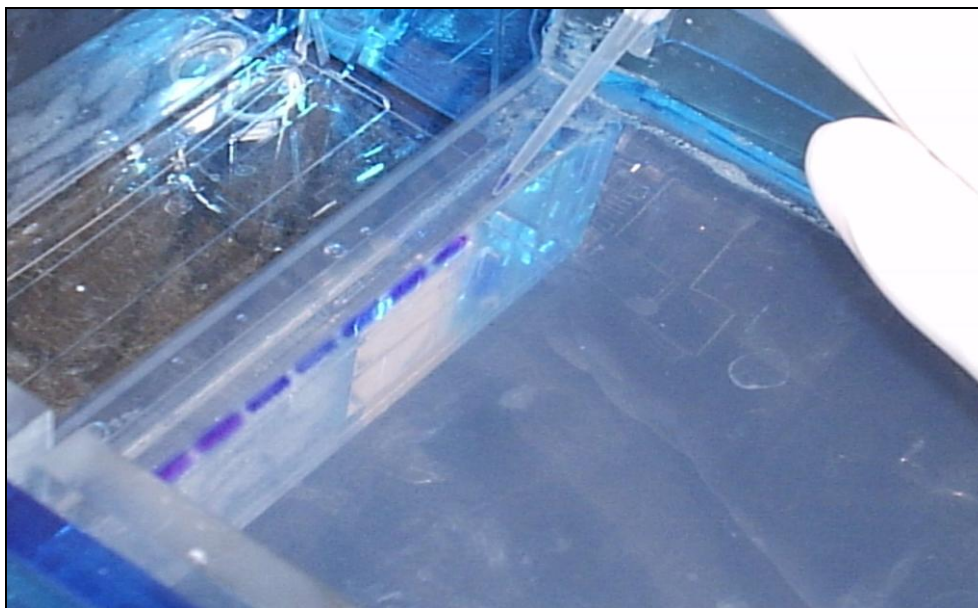


Foto 5.20. Carga de la muestra buffer y ADN bovino en el gel de agarosa.

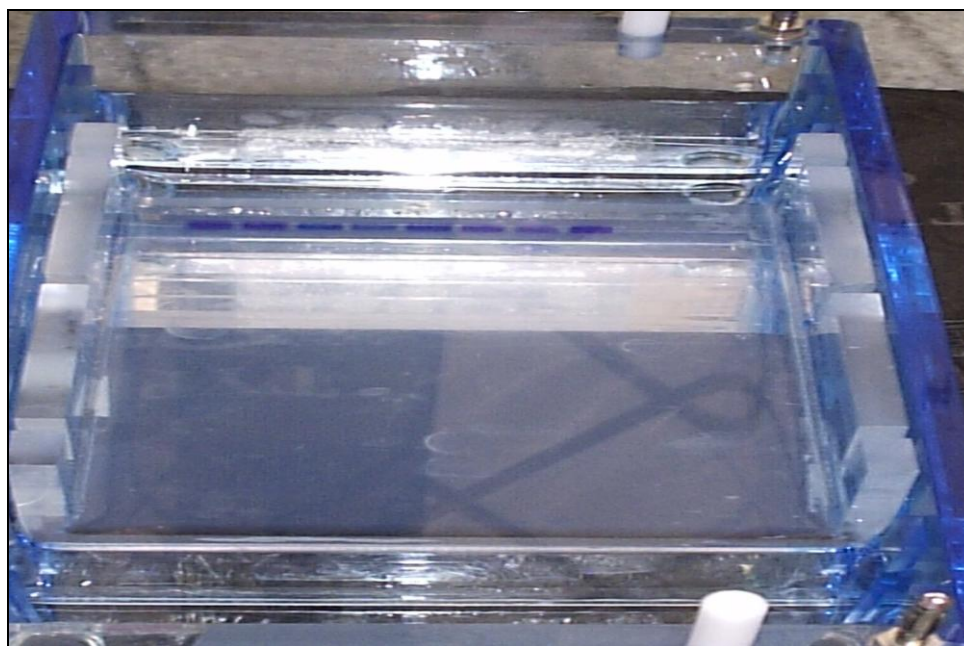


Foto 5.21. Bandeja lista para la corrida electroforética.

Posteriormente fueron sometidos a 120V (Foto 5.22) para que puedan migrar y separarse para ser visualizados bajo luz UV (Foto 5.23).

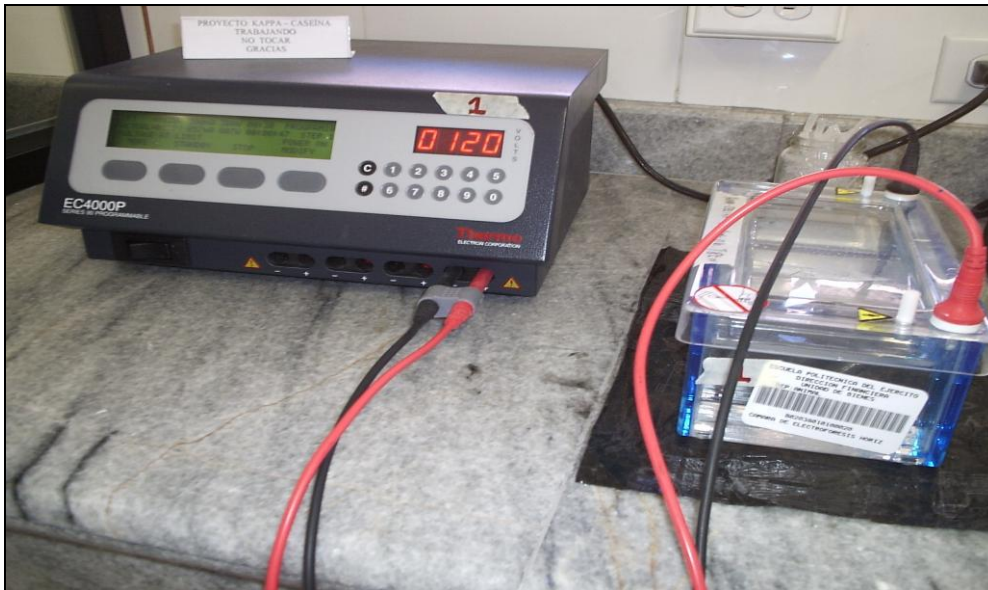


Foto 5.22. Corrida electroforética a 120 V, de las UM bovinas.



Foto 5.23. Visualización de las muestras bajo luz UV.

9. Cuantificación de ADN

Para conocer la concentración y calidad de ADN, se utilizó dos métodos. Un cualitativo, en base a geles de agarosa al 0,8% en condiciones de electroforesis de 120 V

en 45 minutos (Figura 5.2); comparado la intensidad de las bandas con un marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®). (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Concentración de ADN por comparación de intensidad del Marcador Low DNA².

Tamaño del fragmento	Volumen del Low DNA Mass Ladder		
	2 µl	4 µl	8 µl
2000 pb	100 ng	200 ng	400 ng
1200 b	60 ng	120 ng	240 ng
800 pb	40 ng	80 ng	160 ng
400 pb	20 ng	40 ng	80 ng
200 b	10 ng	20 ng	40 ng
100 pb	5 ng	10 ng	20 ng

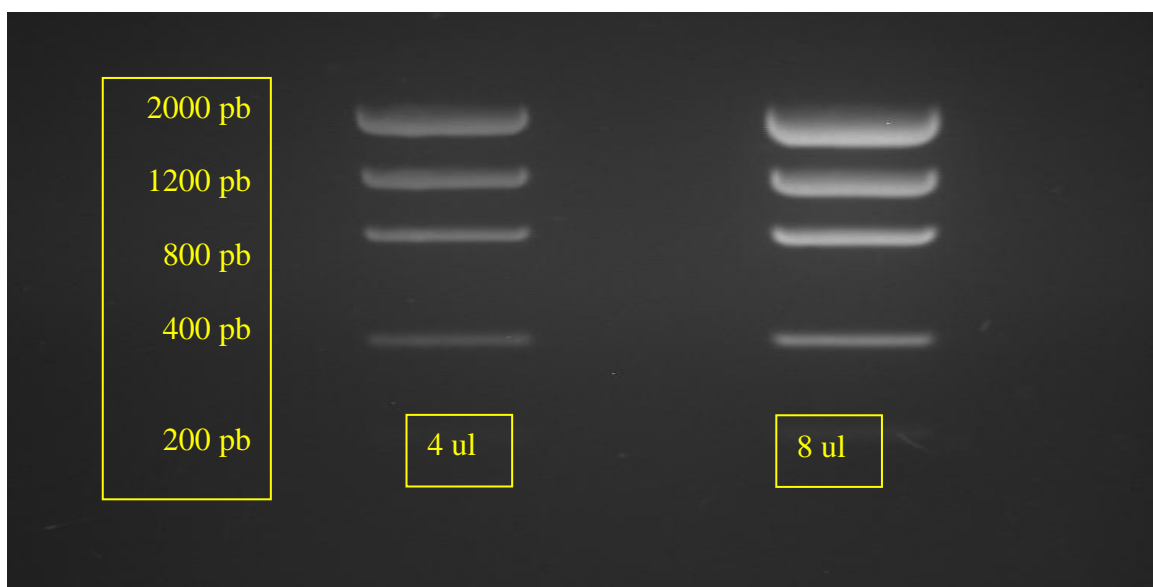


Figura 5.2. Intensidad del Marcador Low Mass Ladder (Invitrogen®), en cantidades de 4 µl y 8 µl, con el tamaño de fragmentos correspondiente.

² Origen: Invitrogen®, Low DNA Mass Ladder. Cat. No. 10068-013

Un cuantitativo con un espectrofotómetro (UV-VIS Dual Beam, Labomed INC) (Foto 5.24), con capacidad de 8 celdas, utilizando cubetas de cuarzo, luz ultravioleta (UV), fuente de poder, corrido bajo software UV-WIN (Foto 5.25). Se midió absorbancia a longitudes de onda 260 y 280 nm; la relación de entre ambos valores es un indicador de la pureza del material extraído (relación el ratio de 1,2 a 1,9), ya que las proteínas absorben luz UV a 280 nm. Posteriormente se procedió a calcular la cantidad de ADN por μl de sangre mediante la formula:

$$\text{ng} \times \mu\text{l}^{-1} \text{ ADN} = \text{Factor de dilución} \times \text{Absorbancia } 260 \text{ nm} \times K$$

Donde K = es $50 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$ para ADN.

La concentración de ADN con Absorbancia 260 nm es igual uno (1).



Foto 5.24. Espectrofotómetro (UV-VIS Dual Beam, Labomed INC), para cuantificar ADN bovino.

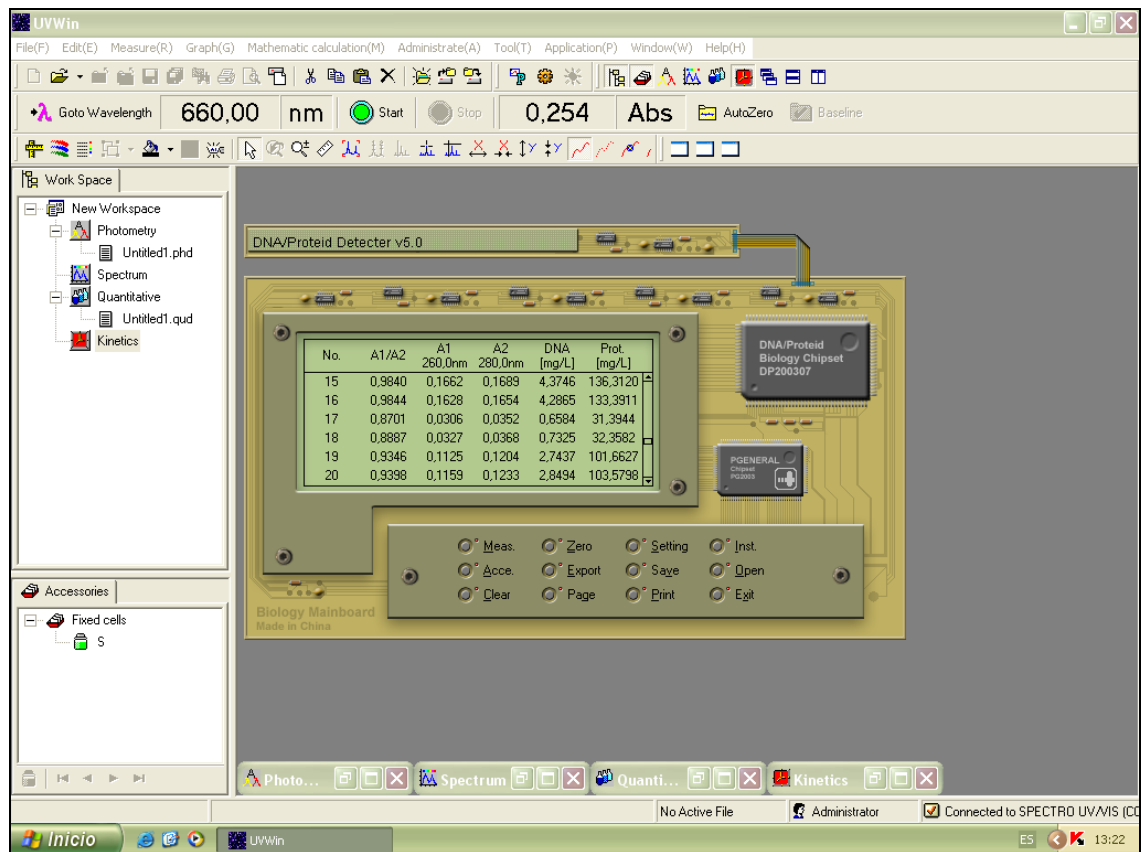


Foto 5.25. Software UV-WIN, para ser utilizado con espectrofotómetro.

10. Selección de los cebadores (primers)

Los cebadores utilizados para la amplificación del gen de la κ -caseína (Cuadro 5.1) fueron seleccionados de los estudios previos de Uffo (2000); López y Vásquez (2004). También se diseñó una propia secuencia de primers, utilizando el programa PRIMER 3³ (ver ANEXO E).

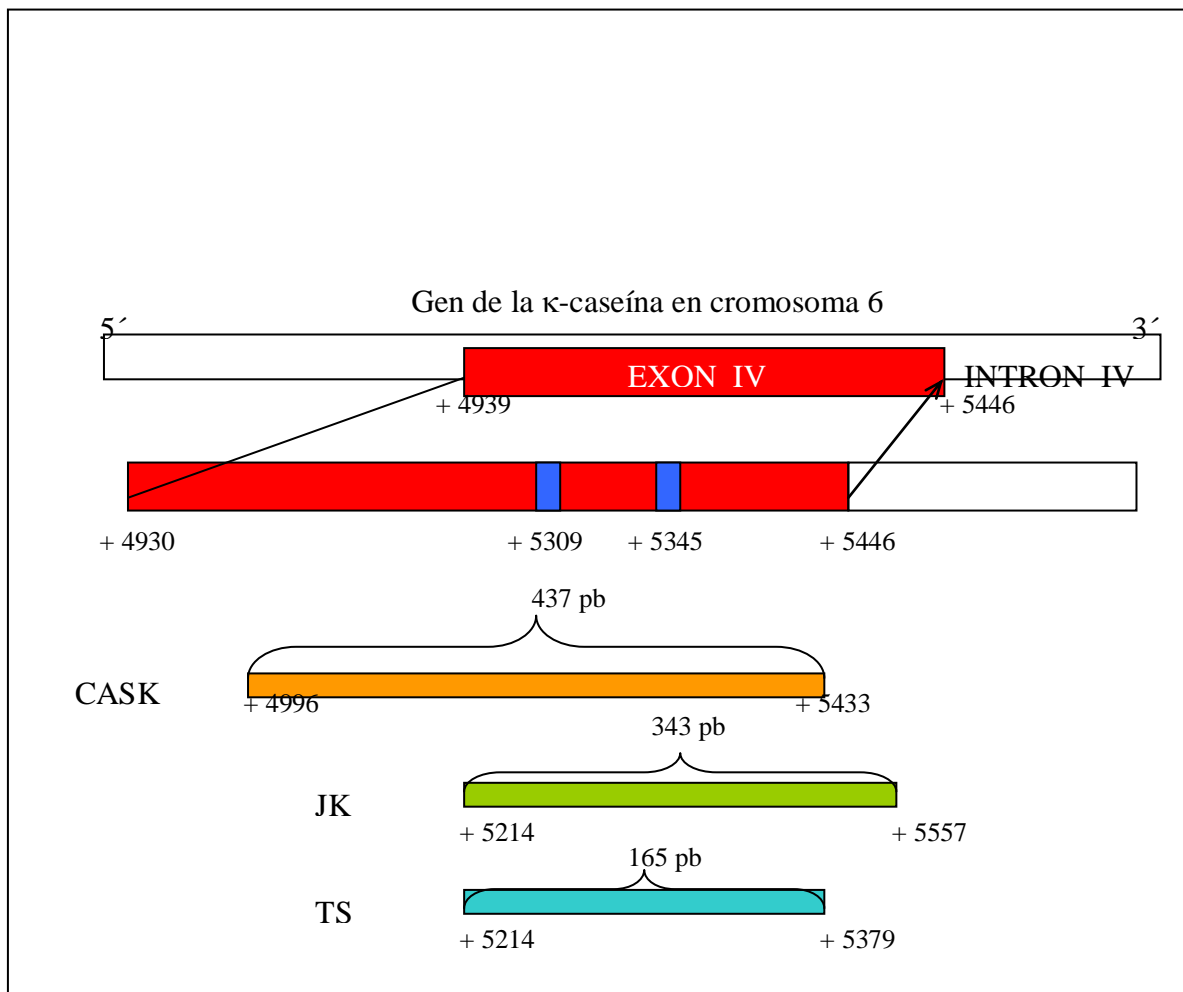
³ Disponible en: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_results.cgi

Cuadro 5.1. Cebadores utilizados para la amplificación de la región estudiada del gen de la κ -caseína.

<i>Loci</i>	Nombre	Secuencia (5'-3')	Pb	Ta (°C)	Referencia
CASK	CASK 1	TGAGCAGGTATCCTAGTTAT	20	50	Osta, 1994
	CASK 2	TGAGTAGGTATCCTAGTTAT	20		
	CASK 3	TTTGATGTCTCCTTAGAGT	20		
CASK	JK 5.1	ATTTATGGCCATTCCACCAAAG	22	53	López y Vásquez 2004
	JK 3.1	AGACAATGTCTCTTCCGCTTTA	22		
CASK	TS01	ATTTATGGCCATTCCACCAA	20	60	Terán y Santillán 2006
	TS02	GATCTCAGGTGGGCTCTCAA	20		

Elaborado: Terán y Santillán, 2006.

Las secuencias de los “primers” (Cuadro 5.1) fueron comparadas dentro de la secuencia del gen de la κ -caseína (ANEXO A), entre el exón IV y parte del intrón IV, del cromosoma 6. Se considero que los polimorfismos en estudio estén dentro del fragmento que flanquean cada cebador. Para el caso de los juegos de cebadores CASK 1+2/ CASK 3 flanquean un fragmento de 437 pb entre los nucleótidos +4996 y +5433 (437 pb del exón IV). Para los cebadores JK 5.1 / JK 3.1 flanquean un fragmento de 343 pb entre los nucleótidos +5214 y +5557 (232 pb del exón IV y 111 pb del intrón IV). Mientras que los juegos de cebadores TS.01 / TS.02 (ANEXO H), flanquean un fragmento de 165 pb entre los nucleótidos +5214 y +5379 (232 pb del exón IV y 67 pb del intrón IV) ver Figura 5.3.



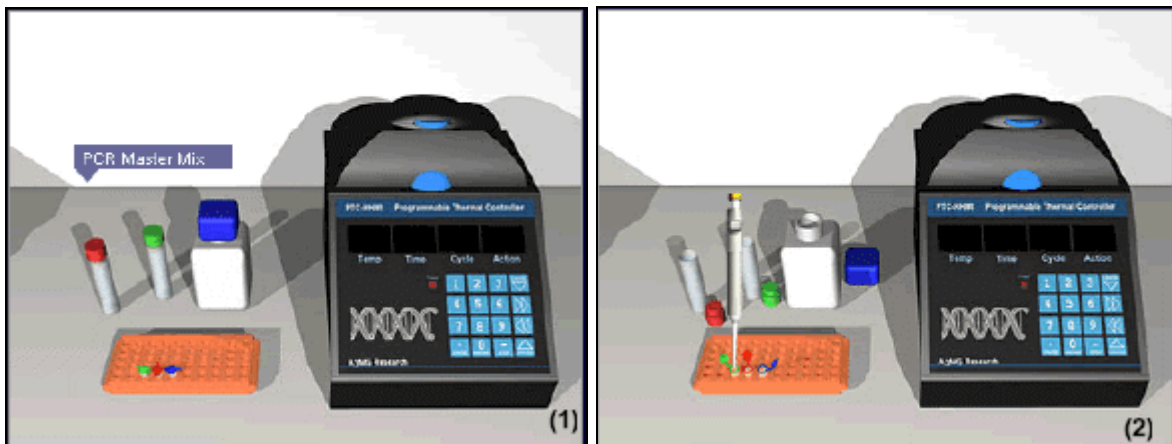
Elaborado: Terán y Santillán, 2006.

Figura 5.3. Ilustración del gen de la κ -caseína y ubicación de los cebadores.

6. Amplificación por PCR del gen de la kappa-caseína

Para la amplificación del gen de la κ -caseína se utilizó la metodología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction). En las siguientes etapas:

Primera etapa: Preparación de la solución madre “Master Mix” para PCR.



Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/identificacion/2.htm>

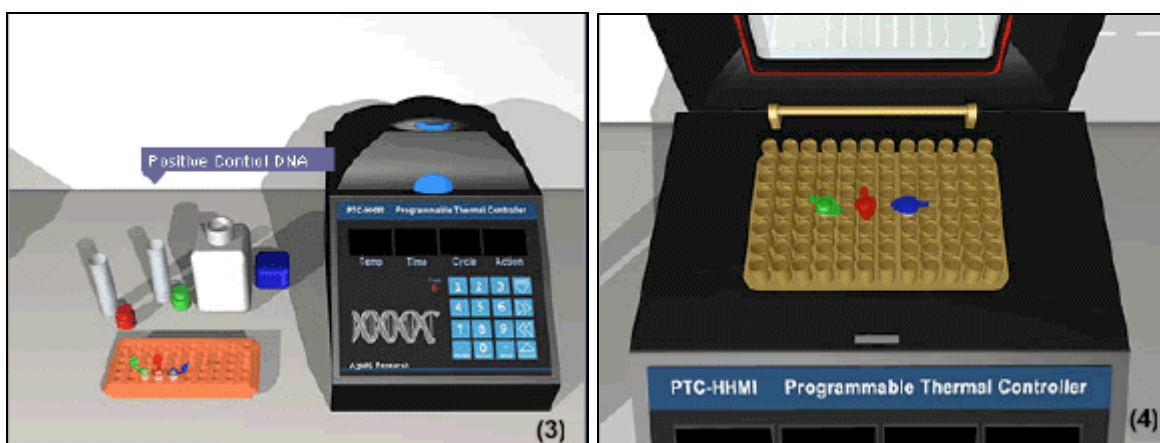
Figura 5.4. Preparación de la solución madre “Master Mix” para PCR.

Para preparar la PCR, se agrega solución master mix de PCR a la muestra de ADN (Figura 5.4.1 y 5.4.2). Esta solución contenía: agua, un buffer que mantiene la mezcla al pH correcto, cantidades adecuadas de los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina, grandes cantidades de “primers” de ADN que se pegan a la región del ADN que codifica al gen en estudio (para iniciar el proceso de replicación) y una ADN polimerasa termoestable para catalizar el alargamiento de la hebra de ADN.

Para lo cual se preparó una mezcla de reacción en un volumen final de 50 μ l, tomando como referencia las condiciones de reacción de la *Taq Polimerasa* (Invitrogen®), (Cuadro 5.2).

Cuadro 5.2. Componentes de la Master Mix para la reacción de la PCR.

Componentes	Concentración final	Volumen
10 X PCR Buffer menos Mg	1 X	5 μ l
10 mM dNTP mezcla	0,2 mM cada uno	1 μ l
50 mM Mg Cl ²	1,5 mM	1,5 μ l
Primer mix (10 mM cada uno)	0,5 μ M cada uno	1 μ l
Taq ADN Polimerasa (5 U/ μ l)	2,5 U	0,5 μ l
ADN molde	50 ng/ μ l	5 μ l
Agua grado PCR	Aforar a volumen final	50 μ l



Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/identificacion/2.htm>

Figura 5.5. Preparación de controles positivos y negativos en la PCR.

Al mismo tiempo se prepararon controles positivos y negativos. El control positivo contiene ADN correspondiente a la región de estudio. La negativa, agua destilada estéril. A ambas se le agrega solución master mix. Una vez que los tubos se colocaron en el termociclador (Figura 5.5.3 y 5.5.4), el termociclador comienza el proceso de replicación del ADN.

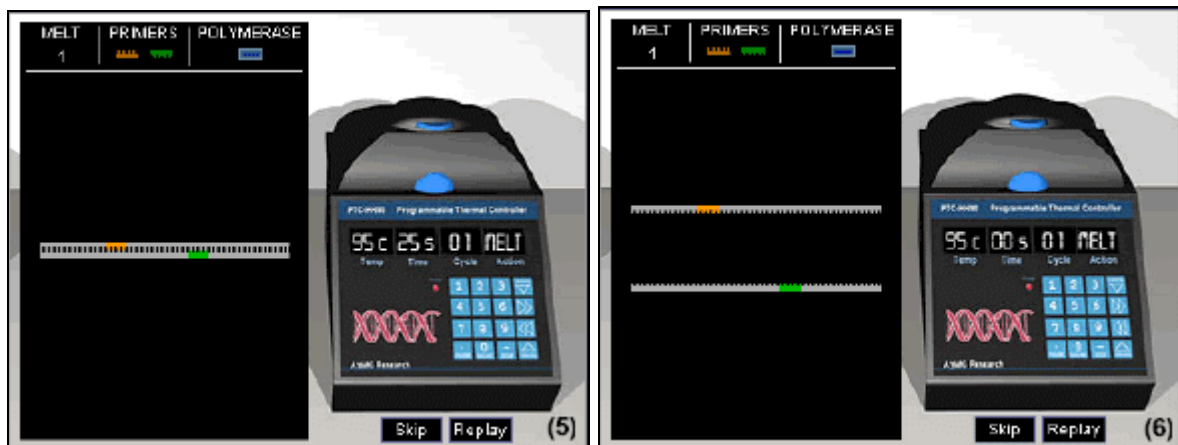
Segunda etapa: Corriendo la PCR



Foto 5.26. Termociclador TECHNE Progene 1999, utilizado para la amplificación del fragmento en estudio.

Se utilizó un termociclador TECHNE Progene (Foto 5.26), con una capacidad de 20 pocillos; las condiciones iniciales de PCR fueron:

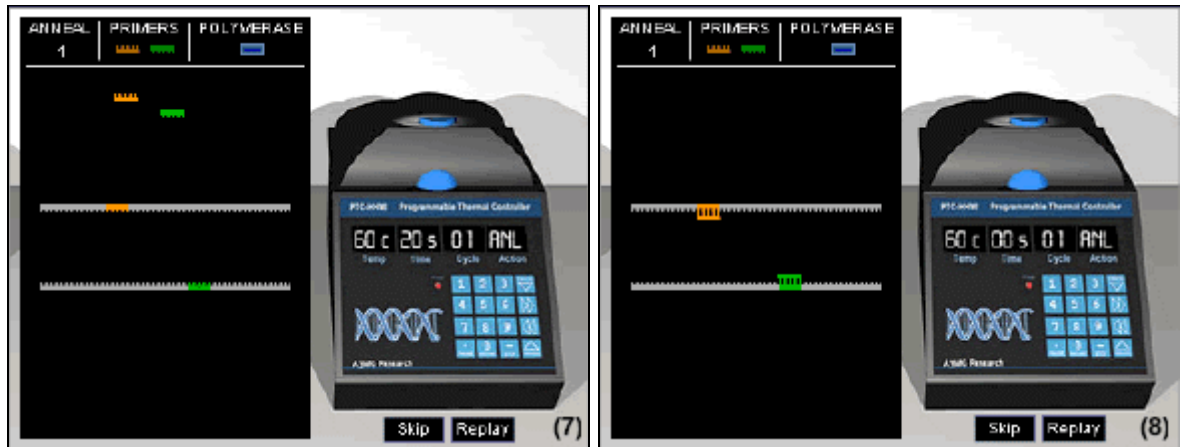
- Etapa inicial de desnaturalización: 94° C por 10 minutos.
- Seguido por 30 ciclos de:



Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/identificacion/2.htm>

Figura 5.6. Primera etapa. Separación del ADN (*melt*).

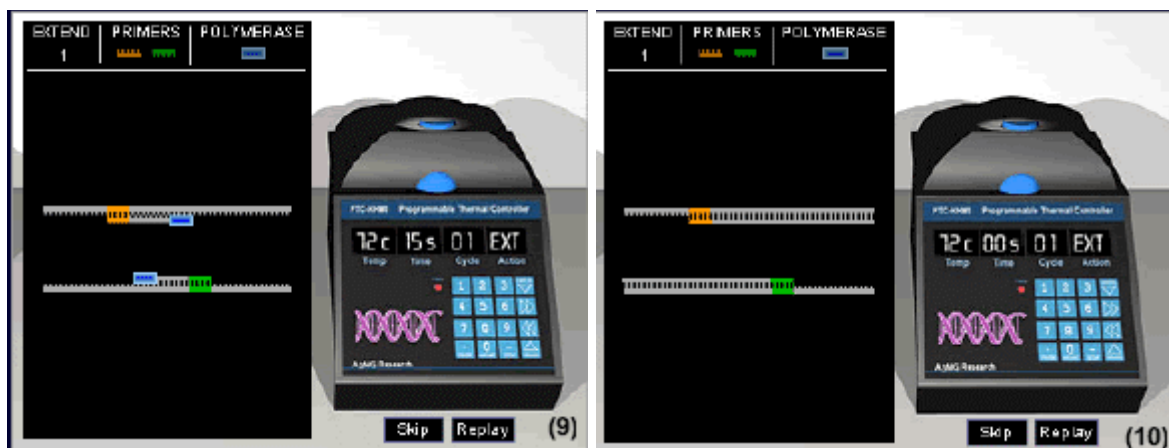
- La primera etapa (*melt*) estuvo destinada a separar las hebras de la doble hélice de ADN, (Figura 5.6), por medio del calentamiento a 94° C durante 45 segundos.



Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/identificacion/2.htm>

Figura 5.7. Segunda etapa. Hibridación de la cadena de ADN.

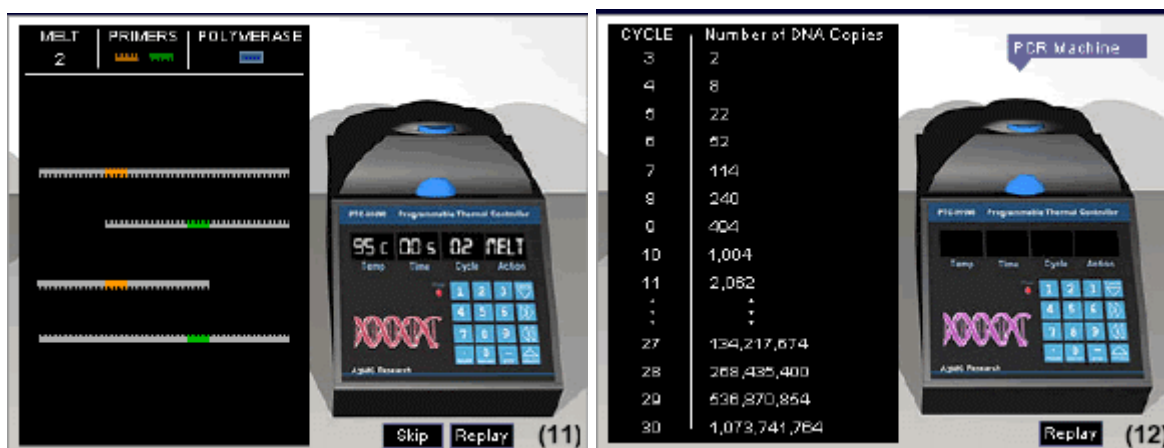
- Hibridación (*Anneal*): Se vario la temperatura de 40° C a 62° C por 1 minuto (Figura 5.7), para realizar una gradiente de temperatura de esta manera se fue regulando la concentración de primer para cada caso.



Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/identificacion/2.htm>

Figura 5.8. Tercera Etapa. Alargamiento de la Cadena de ADN.

- Extensión (*Extend*): 72° C por 30 segundos (Figura 5.8), lo cual permitió a la ADN polimerasa alargar la copia de la hebra de ADN.



Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/identificacion/2.htm>

Figura 5.9. Proceso concluido de la PCR.

- Las tres etapas tardaron 2 minutos y 15 segundos en producirse. Al final de un ciclo se duplico cada pedazo de ADN (Figura 5.9.11). El ciclo puede repetirse hasta 30 veces, y cada nuevo ADN sintetizado actuó como un nuevo molde. Luego de 30 ciclos se obtuvo 1.000.000 copias de ADN (Figura 5.7.12).
- Etapa final de extensión: 72° C por 10 minutos.

Se diseñó una estrategia de amplificación utilizando los juegos de cebadores para la κ -caseína, en sesiones de PCR independiente bajo las condiciones antes mencionadas. En la primera amplificación se utilizaron los cebadores CASK1, CASK2 los cuales se complementan entre sí para formar un cebador inicial que lo denominó CASK1+2 y CASK3 como cebador finalizador, los cuales son específicos para una región de 437 pb.

Luego se utilizaron los cebadores JK5.1 como iniciador y JK3.1 como finalizador los cuales son específicos para una región de 344 pb. Cabe mencionar que el cebador TS.01 es igual al JK5.1 como iniciador; mientras que el TS.02 como finalizador que son específicos para una región de 337 pb. Las cuales fueron adecuadas hasta alcanzar temperaturas de alineamiento teóricas similares a las que presentan los cebadores, además

se hizo una verificación de especificidad consultando la base de datos internacionales utilizando el programa PubMed⁴.

7. Digestión del producto amplificado, RFLP

Se tomó 10 µl de cada uno de los productos amplificados para ser digeridos con la enzima específica para el fragmento en estudio (Cuadro 5.3), en un volumen final de 15 µl, con 1U inicial de la enzima (se evaluó hasta 5 U); 1,5 µl de buffer específico para la enzima *HindIII* y se completó el volumen con agua desionizada. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción a 37° C durante 3h. Se utilizó un termociclador TECHNE TC-512 (Foto 5.27), con una capacidad de 96 pocillos.

Cuadro 5.3. Enzima de restricción para el fragmento del gen amplificado.

Enzima	Organismo	Sitio de reconocimiento
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' - \mathbf{A} \text{ AGCTT} - 3' \\ \\ 3' - \text{TTCGA} \mathbf{A} - 5' \\ \uparrow \end{array}$

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=180>



Foto 5.27. Termociclador TECHNE TC-512 2003, utilizado para la incubación de las muestras con la enzima *HindIII*.

8. Determinación de las variantes alélicas

La identificación de las variantes alélicas se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) en tapón TAE (Tris base, ácido acético y EDTA), ya que es de buen poder tampón, tanto la base (Tris, pKa=8,3), como el ácido acético, (pKa=9,3) tamponan en condiciones de electroforesis. La corrida electroforética se realizó durante 1 hora a un voltaje de 120 V y se visualizaron en un transiluminador UV con cámara fotográfica incorporada.

Se determinaron las variantes alélicas, κ -CN^A y κ -CN^B las cuales difieren en dos mutaciones puntuales en la posición 136 y 148 del gen. El cambio en la posición 148 del residuo de asparagina por el residuo de alanina, elimina un sitio de restricción para la enzima *HindIII* en κ -caseína B. De esta forma se obtuvo para el alelo A un fragmento de

437 pb; y, dos fragmentos de 347 y 90 pb, para el alelo B; mientras que para el genotipo AB, tres bandas de 437, 347 y 90 pb respectivamente.

9. Determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas.

Se realizó una tabla binaria para determinar el genotipo de las Unidades Muestreadas (UM) por recuento simple. Para la variabilidad genética se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas analizando las UM respecto a la condición de equilibrio génico según Hardy Weinberg con la prueba de (Chi cuadrado).

Se realizaron las correlaciones con tablas de contingencia entre las frecuencias alélicas y datos de producción. Utilizando el “Software” SPSS-12 para el análisis de varianza y pruebas de regresión lineal.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN PARTIENDO DE SANGRE PERIFÉRICA

Según las tres metodologías utilizadas se obtuvo el material genético (ADN), a partir del cual se evaluó la concentración y la pureza del mismo; esto último mediante la corrida electroforética en geles de agarosa al 0.8%, de las muestras junto con un marcador de referencia, conocido como Marcador Low DNA Mass Ladder, el cual permite aproximar la concentración y cantidad de ADN, comparando la intensidad de las bandas de las muestras, con la intensidad de las bandas del marcador.

En la Figura 6.1, se puede visualizar la intensidad de las bandas de ADN, siguiendo los protocolos de extracción de Uffo (2000), y Uffo (2000) modificado en esta investigación; las de menor intensidad y las de mayor intensidad respectivamente, las cuales mediante el empleo de la Tabla 6.1, se determinó una concentración de ADN aproximadamente de 40 a 80 ng, a esta concentración de ADN no fue posible amplificar el fragmento del gen de la κ -caseína.

Tabla 6.1. Relación entre intensidad de las bandas de las muestras, con la intensidad de las bandas del Marcador Low DNA Mass Ladder, para determinar la concentración de ADN.

	Volúmen del Low DNA Mass Ladder
--	--

Tamaño del fragmento	2 μ l	4 μ l	8 μ l
2000 pb	100 ng	200 ng	400 ng
1200 b	60 ng	120 ng	240 ng
800 pb	40 ng	80 ng	160 ng
400 pb	20 ng	40 ng	80 ng
200 pb	10 ng	20 ng	40 ng
100 pb	5 ng	10 ng	20 ng

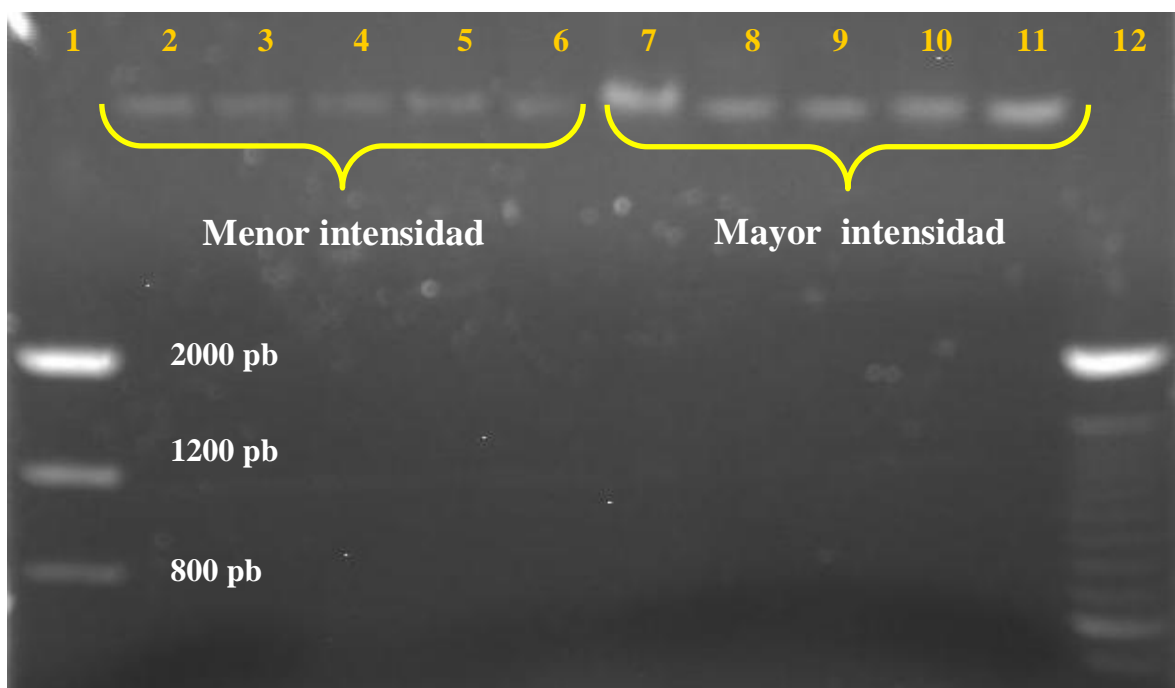


Figura 6.1. Intensidad de bandas de ADN bovino. Menor intensidad corresponden a la metodología Uffo (2000); y de mayor intensidad, corresponden a la metodología Uffo (2000) modificado en esta investigación.

Se empleó el Kit Genomic DNA Wizard, de la casa comercial Promega®, con las soluciones específicas para cada fase de la extracción hasta llegar a la rehidratación del ADN, mediante la utilización de este Kit comercial, se pudo obtener ADN a una concentración de 120 a 200 ng aproximadamente, lo cual se puede visualizar en la Figura 6.2, y la Tabla 6.2 respectivamente.

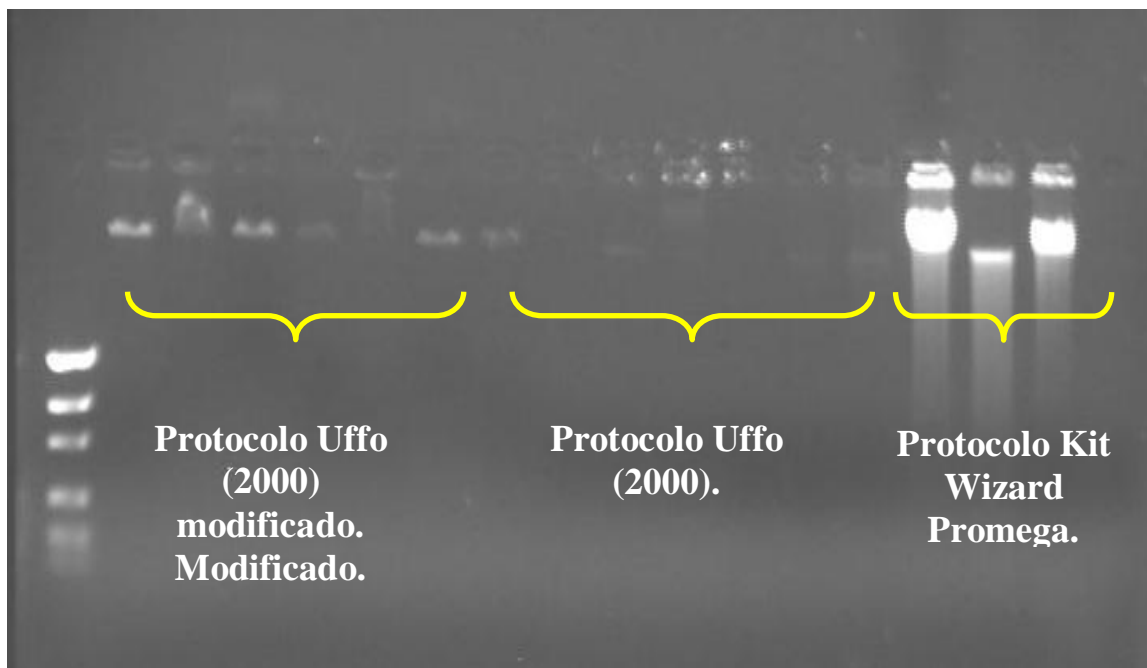


Figura 6.2. Intensidad de bandas de ADN bovino, obtenidas por 3 metodologías distintas.

Tabla 6.2. Relación entre intensidad de las bandas de ADN las muestras utilizando el Kit Wizard Promega, con la intensidad de las bandas del Marcador Low DNA Mass Ladder, para determinar la concentración de ADN.

Tamaño del fragmento	Volúmen de Low DNA Mass Ladder		
	2 μ l	4 μ l	8 μ l
2000 pb	100 ng	200 ng	400 ng
1200 pb	60 ng	120 ng	240 ng
800 pb	40 ng	80 ng	160 ng
400 pb	20 ng	40 ng	80 ng
200 pb	10 ng	20 ng	40 ng
100 pb	5 ng	10 ng	20 ng

Con la concentración de 120 a 200 ng de ADN, se consiguió amplificar el fragmento del gen de la κ -caseína, objeto de estudio; al parecer las soluciones del Kit guardan mayor afinidad entre ellas, así como los tiempos de incubación y de temperatura, tanto para la destrucción de los eritrocitos, como para la incubación con la proteinasa K, están mejor determinados, en comparación con los protocolos de Uffo (2000) y Uffo (2000) modificado; lo que permite obtener ADN en mayor concentración y pureza.

Por esta particularidad se extrajo ADN de todas las muestras, utilizando el Kit Wizard Promega, donde se pudo obtener un ADN de buena concentración y pureza, como muestra la Figura 6.3; las mismas que permitieron amplificar un fragmento de 437 pb del gen de la κ -caseína, de las muestras analizadas de los animales estudiados.



Figura 6.3. Visualización de la intensidad de las bandas de ADN bovino, obtenidas utilizando el Kit Wizard Promega.

B. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN DE LA KAPPA-CASEÍNA

1. Selección de los cebadores (primers)

Al tener ADN de buena concentración (120 a 200 ng/ml), fue necesario optimizar el protocolo y las condiciones de PCR de Uffo (2000), para lograr la amplificación del fragmento del gen de la κ -caseína.

Seleccionados los “primers” CASK, se procedió a la reconstitución, evaluación y la visualización de los mismos (Figura 6.4).

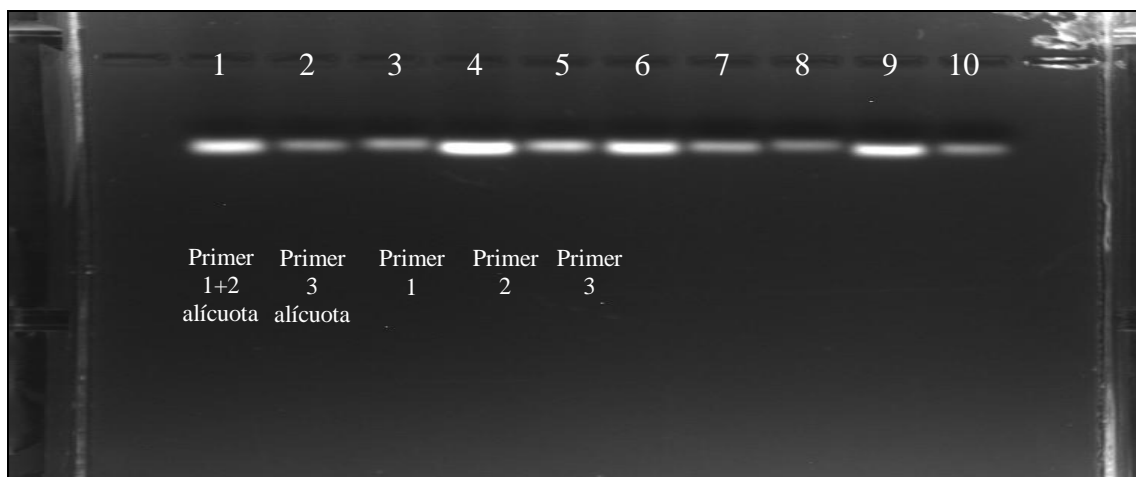


Figura 6.4. Evaluación de la reconstitución de los “primer” CASK a 75 pmol y su visualización en gel de agarosa.

Mediante la formula para calcular la temperatura de “melting”, que es una temperatura teórica (T_m , “melting temperature”) de los “primers” ($T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$) (Cuadro 6.1), se determinó que no existía diferencia de temperatura $\pm 5^\circ C$, entre el “primer” iniciador CASK 1+2 con respecto al “primer” finalizador CASK 3, por lo tanto no existió complementariedad entre ellos en la reacción de la PCR. Se realizaron pruebas de reacción sencillas utilizando las concentraciones recomendadas para la preparación de la Master Mix de la Taq polimerasa (Invitrogen®), en un volumen final de 50 μl , variando un rango de temperatura de “annealing” de $40^\circ C$ a $62^\circ C$, que es la temperatura donde se obtuvo la reacción.

Cuadro 6.1. Comparación de las T_m , de cada juego de primers.

Cebadores	$T_m^\circ C$	$\pm 5^\circ C$	Observaciones
CASK 1 + 2	$55^\circ C$	$3^\circ C$	Los cebadores CASK SI cumplen
CASK 3	$52^\circ C$		
JK. 5.1	$62^\circ C$	$0^\circ C$	Los cebadores JK SI cumplen
JK. 3.1	$62^\circ C$		
T.S. 01	$56^\circ C$	$6^\circ C$	Los cebadores T.S NO cumplen
T.S. 02	$62^\circ C$		

2. Optimización de la PCR

En las primeras pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se utilizaron; $MgCl_2$, dNTPs, Buffer de PCR, “primers” (cebadores) y Taq polimerasa,

empleando cantidades y condiciones descritas y recomendadas por el protocolo de Uffo 2000, empleando un rango de temperatura de de “annealing” de 42° hasta 60° C.

Al realizar varias pruebas de amplificación con el protocolo antes mencionado y no conseguir amplificar el fragmento del gen de la κ -caseína; sino visualizar únicamente “primer dimmer” (Figura 6.5), se variaron las concentraciones de los “primers” CASK, desde una concentración inicial de 75 pmol hasta una final de 50 pmol; también, se tuvieron que variar las condiciones de temperatura del protocolo de Uffo (2000), ajustado a las condiciones del laboratorio de Biotecnología, considerando un intervalo de variación de temperatura $\pm 5^\circ$ C, de la temperatura de “annealing” calculada que fue de 54° C; razón por la cual se realizaron pruebas de PCR a una temperatura de 50° C, obteniendo la amplificación del fragmento del gen.

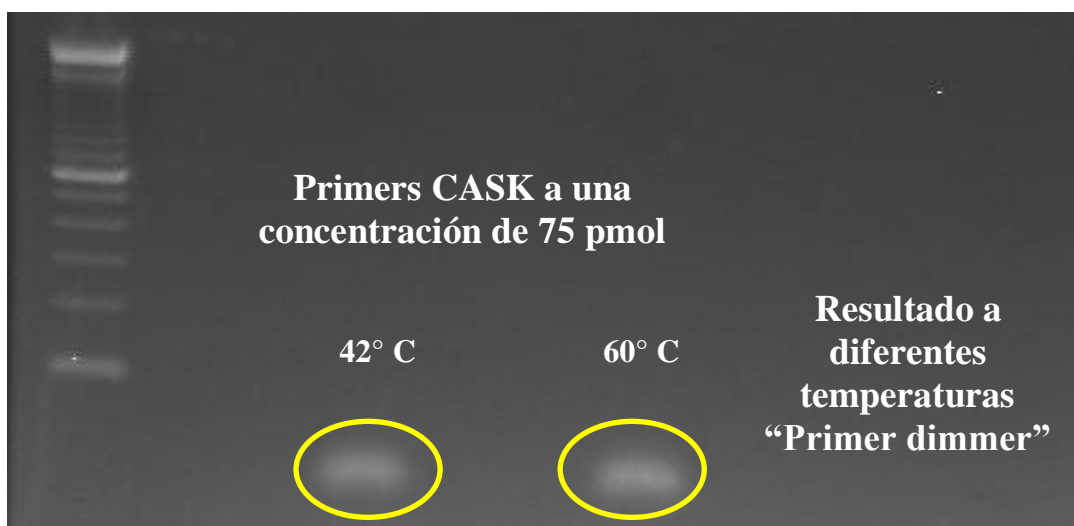


Figura 6.5. Fragmento no amplificado del gen de la κ -caseína en los ensayos de optimización de la PCR.

Para conocer si los “primers” CASK, estaban bien diseñados en su secuencia y ver si encajaban en la secuencia del fragmento del gen; se tuvo acceso a la secuencia completa en pares de bases del gen de la κ -caseína, ubicándose y centrándose en el exón IV del cromosoma 6 bovino, considerando que los polimorfismos objeto de estudio estuvieran dentro del fragmento que flanquea cada cebador. Para el caso de los juegos de cebadores CASK 1+2/ CASK 3 que flanquean un fragmento de 437 pb, entre los nucleótidos: +4996 y +5433 (437 pb del exón IV). Y, para los cebadores empleados por

López y Vásquez (2004) de un estudio previo para analizar el gen de la k-caseína en embriones bovinos denominados JK 5.1 / JK 3.1, los mismos que flanquean un fragmento de 343 pb entre los nucleótidos +5214 y +5557 (232 pb del exón IV y 111 pb del intrón IV). Mientras que los juegos de cebadores TS.01 / TS.02, que flanquean un fragmento de 165 pb entre los nucleótidos +5214 y +5379 (232 pb del exón IV y 67 pb del intrón IV) (Figura 5.1).

Al conocer la secuencia y la posición en la que encajaban cada uno de los “primers” en el fragmento del gen a amplificar, se prepararon varias soluciones stock o master mix de PCR adicionada a cada una de las muestras de ADN de los animales analizados. Esta solución contenía: agua libre de nucleasas; un buffer (1X) específico para PCR, el mismo que mantiene la solución a pH adecuado para que se produzca la reacción; $MgCl_2$ (1,5 μM) como catalizador de la *Taq* polimerasa, para la adición de bases y complementar las cadenas de ADN; dNTPs en concentración óptima (20 mM) de los nucleótidos de: adenina, timina, citosina y guanina. “Primers” a una concentración de 50 pmol, los cuales identifican la región de ADN que codifica al gen (para iniciar el proceso de replicación); y, una enzima termoestable, la *Taq* ADN polimerasa (2,5 U) para catalizar el alargamiento de la hebra de ADN.

Se prepararon muestras que sirvieran tanto como control positivo y negativo, para descartar posibles contaminaciones de los reactivos empleados en el ensamblaje de la PCR; lo que las diferencian a una de la otra, es que el control positivo contiene ADN correspondiente a la región de estudio; mientras que la negativa, en lugar de ADN, contenía agua destilada estéril, a un volumen final de 50ul.

3. Etapas de la PCR

Las condiciones de PCR, con sus respectivas variaciones en tiempos y temperatura de “annealing”, con respecto al Protocolo de Uffo (2000) modificado en este estudio, se describen a continuación:

- Etapa inicial de desnaturalización: 94° C por 4 minutos.

Seguido por 30 ciclos de:

- El primer segmento de desnaturalización “melt” estuvo destinada a separar las hebras de la doble hélice de ADN, por medio del calentamiento a 94° C durante 45 segundos.
- El segundo segmento hibridación “annealing”, que consiste en la fusión de los cebadores a la cadena sencilla de ADN, consistió en 1 minuto a 50° C.
- El tercer segmento destinado a la extensión de la cadena de ADN, junto con la adición de bases para la complementación y formación de la doble cadena de ADN, consistió en 30 segundos a 72° C.
- Finalmente la etapa de extensión final, a 72° C por 4 minutos.

Otro factor que influyó y que se consideró fueron los tiempos de rampa que emplean los termocicladores utilizados; al calcular los tiempos de rampa de los dos termocicladores TECHNE TC-512, empleados en el laboratorio de Biotecnología, éstos poseen un tiempo de rampa mayor, con respecto a un tercer termociclador TECHNE, modelo Progene; lo cual influyó al momento de amplificar el fragmento del gen de la κ -caseína, razón por la cual se utilizó exclusivamente para el presente trabajo el termociclador TECHNE modelo Progene, por el motivo descrito anteriormente.

En la Figura 6.6, se pueden visualizar las amplificaciones del fragmento del gen de la κ -caseína, en una banda que corresponde a 437 pb. Se amplificaron todas las

muestras de los animales estudiados, para ser analizados posteriormente mediante la técnica de RFLPs, para la detección de las variantes alélicas de los animales seleccionados para cumplir con los objetivos trazados en la presente investigación.

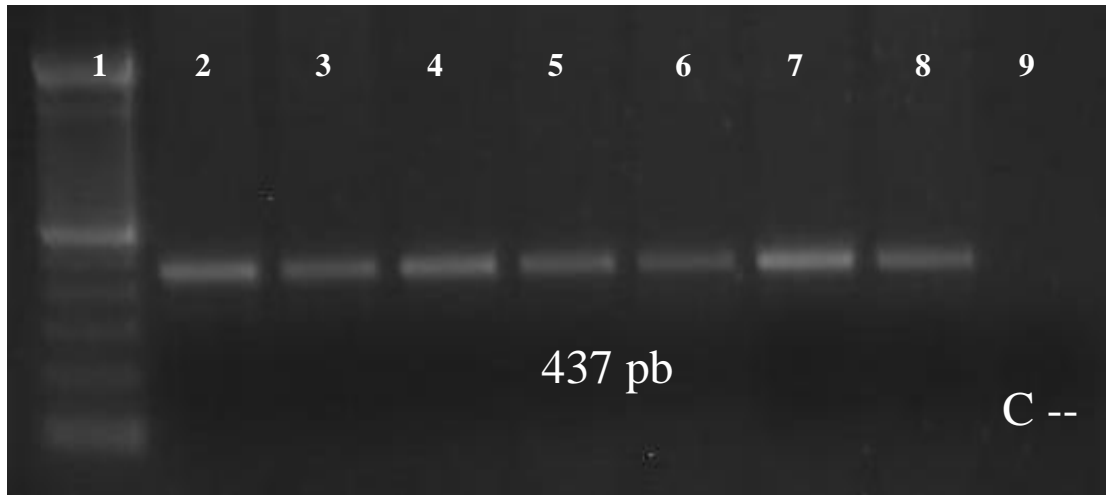


Figura 6.6. Fragmentos amplificados del gen de la κ -caseína bovina, correspondiente a 437 pb.

C. DIGESTION DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

Optimizada y estandarizada la reacción de PCR, se empezó con la utilización de la técnica de RFLPs (Restriction Fragment's Length Polimorphism), mediante el empleo de la enzima de restricción, *HindIII*; la misma que reconoce la secuencia de los polimorfismos para detectar las mutaciones y por ende las variantes alélicas del gen de la κ -caseína, esto mediante el sitio de reconocimiento de la secuencia AA GCTT, la misma que se encuentra presente en la posición +5343 del gen de la κ -caseína, y origina un fragmento de 437 pb para la variante alélica A; y dos fragmentos de 347 y 90 pb para la variante alélica B, del gen de la κ -caseína.

Las condiciones de restricción para las muestras analizadas fueron de; 1U de *HindIII*; 10 μ l del producto amplificado; 1,5 μ l de Buffer específico para la enzima; y 3,4 μ l de agua libre de nucleasas, aforada a un volumen final de 15 μ l.

La incubación con la enzima fue de 3h a una temperatura de 37° C se utilizó un termociclador TECHNE TC-512 , con una capacidad de 96 pocillos.

En las Figuras 6.8, 6.10 y 6.12 respectivamente, se visualizan los productos digeridos de las muestras analizadas, para la determinación de las variantes alélicas A y B, de los genotipos encontrados en los animales seleccionados. En las Figuras 6.9, 6.11 y 6.13 respectivamente se presentan las bandas con los colores invertidos para una mejor visualización.

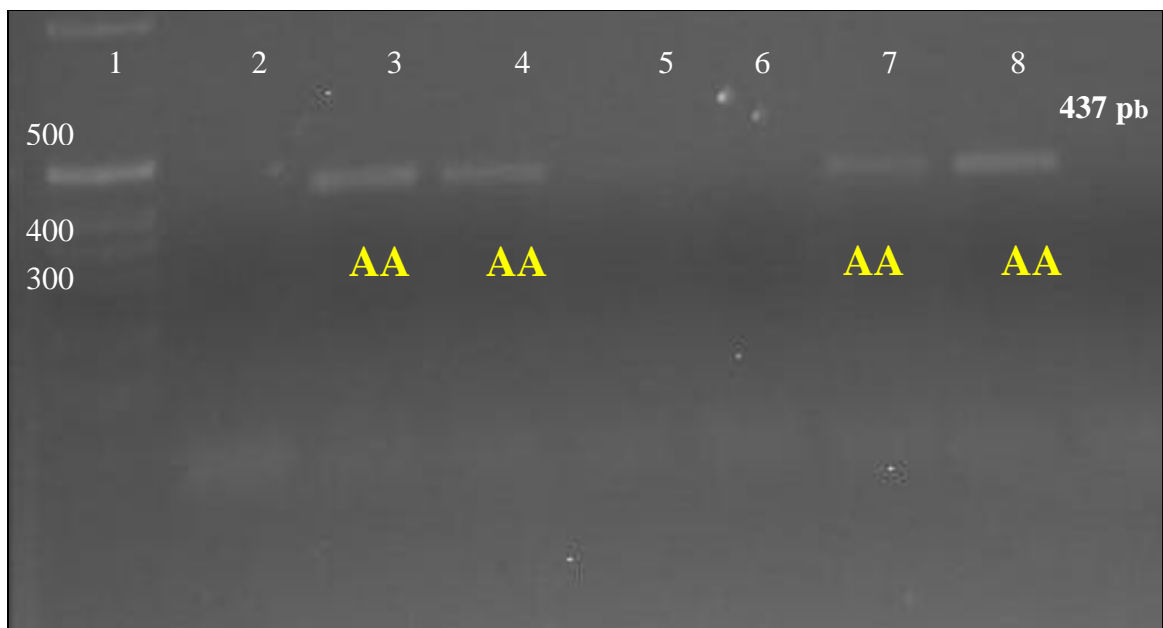


Figura 6.8. Visualización de la banda de 437 pb, correspondiente a la variante alélica AA, luego del corte con la enzima de restricción *Hind*III durante 3h de incubación. Gel de agarosa al 3 %, condiciones de electroforesis 120 V, en 1h.

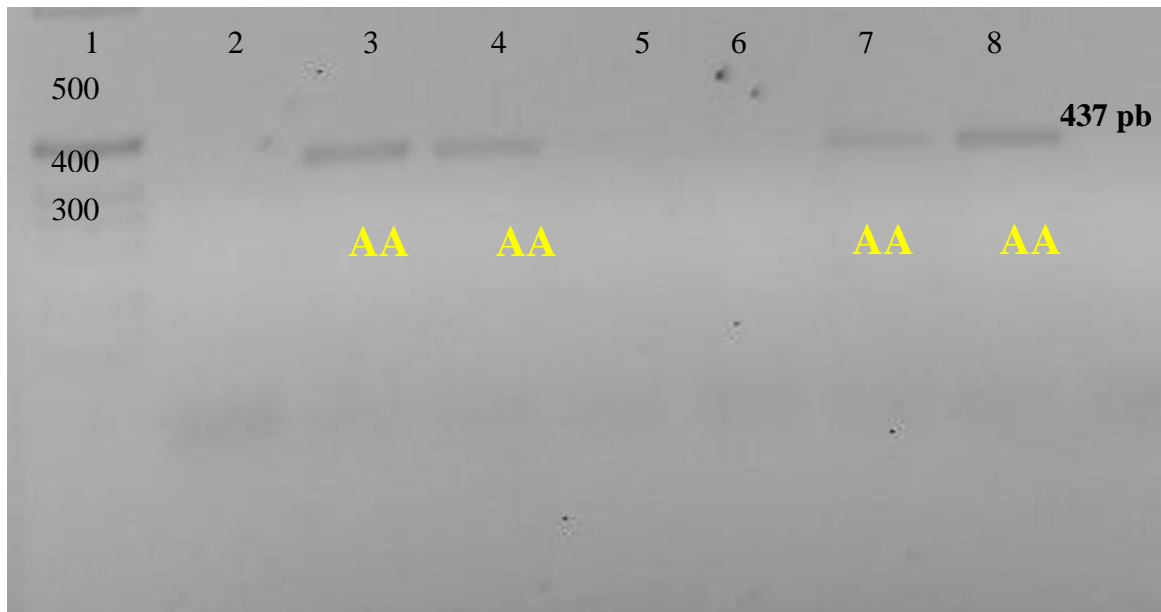


Figura 6.9. Colores invertidos de la Figura 6.8

Carril	Muestra	Carril	Muestra
1	MM 100 pb	7	T21
2	Libre	8	T22
3	T2	9	libre
4	T4	10	libre
5	libre	11	
6	Libre	12	



Figura 6.10. Visualización de la banda de 437 pb y 347 pb, correspondiente a la variante alélica AB, luego del corte con la enzima de restricción *HindIII* durante 3h de incubación. Gel de agarosa al 3 %, condiciones de electroforesis 120 V, en 1h.

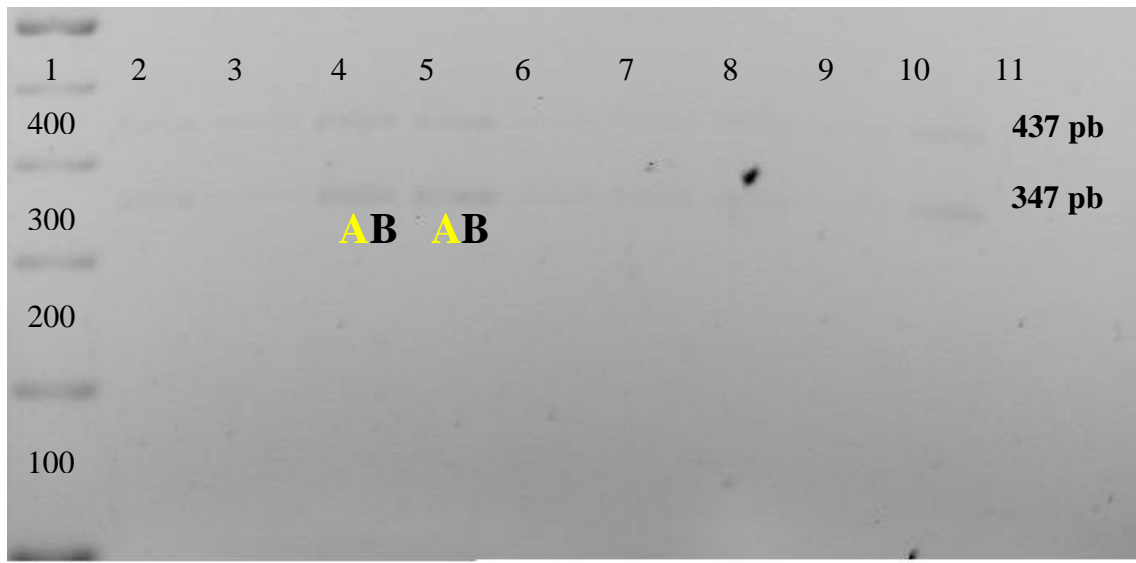


Figura 6.11. Colores invertidos de la Figura 6.10.

Carril	Muestra	Carril	Muestra
1	MM 100 pb	7	T19
2	T15	8	T15
3	T19	9	T19
4	T15	10	T15
5	T19	11	
6	T15	12	

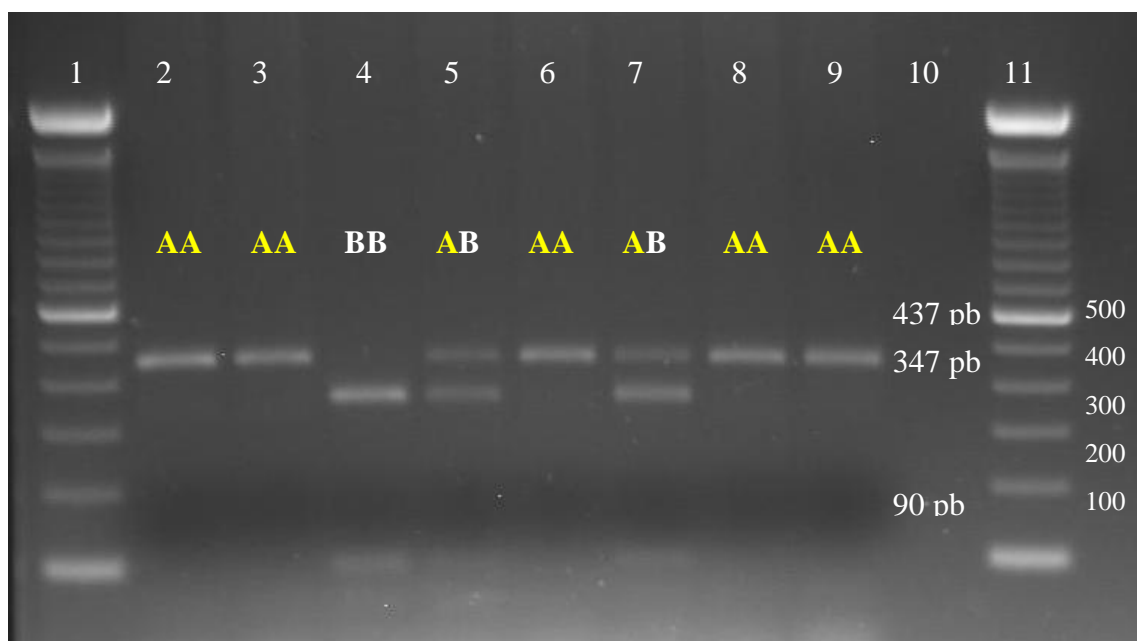


Figura 6.12. Visualización de las bandas de: 437, 347 y 90 pb; para los genotipos AA, AB y BB respectivamente. Gel de agarosa al 3 %, condiciones de electroforesis 120 V, en 1h.

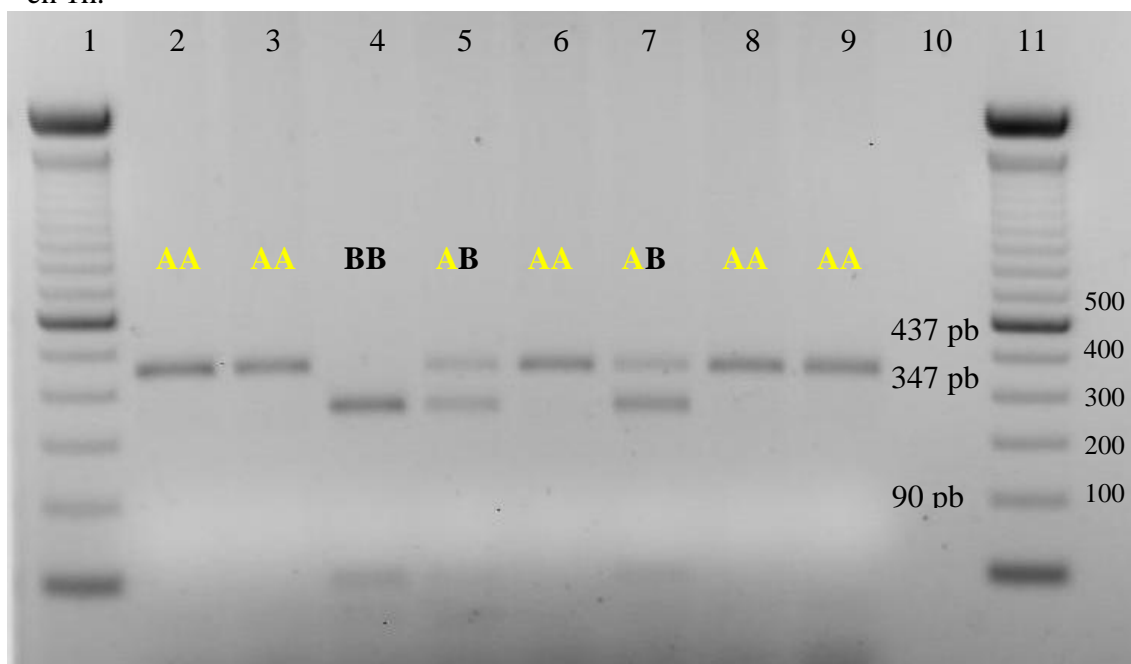


Figura 6.13. Colores invertidos de la Figura 6.12

Carril	Muestra	Carril	Muestra
1	MM 100 pb	7	T75
2	T69	8	T77
3	T70	9	T87
4	T72	10	Libre
5	T73	11	MM 100 pb
6	T74	12	

En la Figura 6.12, se visualizan las bandas correspondientes a cada uno de los genotipos reportados; como muestran los carriles 2, 3, 6, 8 y 9, de la banda de 437 pb, para el genotipo AA. En el carril 4, las bandas de 347 y 90 pb, para el genotipo BB; mientras que los carriles 5 y 7, las bandas de 437, 347 y 90 pb para el genotipo AB.

G. DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS.

1. Análisis general de la Muestra

En el Cuadro 6.2, se presenta la identificación de cada una de las Unidades de Muestreo (UM), conformada de 34 animales, 10 de ellos machos y 24 hembras, además se presenta de manera binaria la determinación del genotipo dentro de cada una de las UM seleccionadas. Para los fragmentos visualizados se asignó el uno (1) y cuando no se visualizó dicho fragmento se asignó el cero (0). De esta manera se pudo determinar que para el genotipo AA corresponde a 100, para AB corresponde 111 y para el genotipo BB corresponde 011.

Cuadro 6.2. Tabla con valores binarios (0-1) para determinar el genotipo de las Unidades de Muestreo (UM).

Ord	Muestra	Identificación	Sexo	Fragmentos			Resultado	Genotipo
				437	347	90		
1	T2	170-00	H	1	0	0	100	AA
2	T4	1291-97	H	1	0	0	100	AA
3	T9	666-99	H	1	1	1	111	AB
4	T15	1178-99	H	1	1	1	111	AB
5	T19	707-05	M	1	1	1	111	AB
6	T21	620-01	H	1	0	0	100	AA
7	T22	1084-00	H	1	0	0	100	AA
8	T53	47-06	M	1	0	0	100	AA
9	T58	52-06	H	1	0	0	100	AA
10	T59	53-06	M	1	0	0	100	AA
11	T63	57-06	M	1	0	0	100	AA

12	T64	58-06	M	1	0	0	100	AA
13	T66	60-06	M	1	0	0	100	AA
14	T67	61-06	H	1	0	0	100	AA
15	T69	689-05	M	1	0	0	100	AA
16	T70	205-00	H	1	0	0	100	AA
17	T72	SN	M	0	1	1	11	BB
18	T73	29-97	H	1	1	1	111	AB
19	T74	1562-06	H	1	0	0	100	AA
20	T75	1563-06	M	1	1	1	111	AB
21	T77	402-96	H	1	0	0	100	AA
22	T87	1344-89	H	1	0	0	100	AA
23	T71	983-96	H	1	0	0	100	AA
24	T76	30-93	H	1	1	1	111	AB
25	T78	1308-01	H	1	0	0	100	AA
26	T82	42-96	H	0	1	1	11	BB
27	T83	1026-96	H	1	0	0	100	AA
28	T85	436-97	H	1	0	0	100	AA
29	T86	1495-00	H	1	1	1	111	AB
30	T88	563-04	M	0	1	1	11	BB
31	T89	240-93	H	1	1	1	111	AB
32	T90	1444-01	H	1	1	1	111	AA
33	T91	162-02	H	1	1	1	111	AB
34	T92	89-99	H	1	1	1	111	AA

En el Cuadro 6.3, se presenta los resultados globales de los genotipos encontrados en todos los animales seleccionados (UM) para el proyecto de investigación. Se identifico 22 animales con el genotipo AA, 9 animales con el genotipo AB y 3 animales con el genotipo BB, de un total de 34 UM, objetivamente se puede apreciar en el Grafico 6.1.

Cuadro 6.3. Resultado global de los genotipos encontrados en animales de la Hda. ESPE “San Antonio”.

Genotipo	Binario	U. de Muestreo
AA	100	22
AB	111	9
BB	011	3
Total:		34

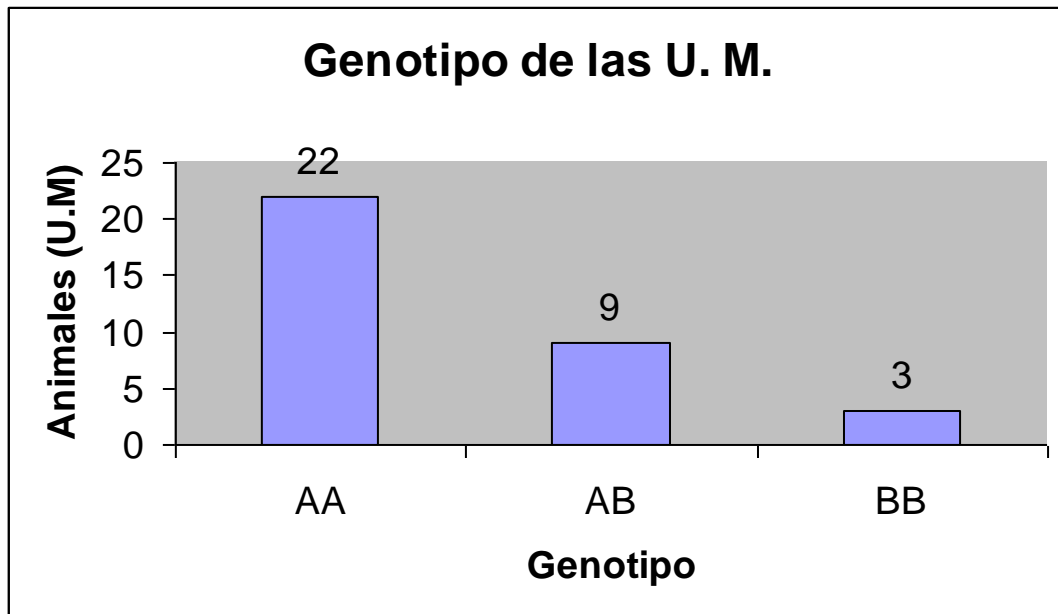


Grafico 6.1. Genotipo de las Unidades de Muestreo.

Para el análisis estadístico de la variabilidad genética se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas y el equilibrio génico según Hardy-Weinberg, con la prueba de χ^2 (Chi cuadrado). (Cuadros 6.4, 6.5, 6.6 y 6.7).

En el Cuadro 6.4, las frecuencias de D, H y R (AA, AB, BB) no son iguales. En consecuencia, la población no se encuentra en equilibrio y no existe cruzamiento al azar para este locus (Felmer y Butendieck, 1998).

Cuadro 6.4. Cálculo para determinar la frecuencia genotípica observada de las UM seleccionadas.

Genotipo	A1A1	A1B2	B2B2	Total
F. Absoluta	N11	N12	N22	N
F. Relativa	D	H	R	1

Genotipo	AA	AB	BB	Total
----------	----	----	----	-------

F. Absoluta	22	9	3	34
Observado	0,65	0,26	0,09	1,00

Cuadro 6.5. Cálculo para determinar la frecuencia alélica de las UM seleccionadas.

Alelo	A1	B1	Total
F. Absoluta	2 N11 + N12	2 N22 + N12	2 N
F. Relativa	p	q	1

Alelo	A1	B1	Total
F. Absoluta	2(22) + 9	2(3) + 9	2 (34)
	53	15	68
F. Relativa	0,78	0,22	1,00

Cuadro 6.6. Cálculo para determinar la frecuencia genotípica esperada de las UM seleccionadas.

Genotipo	AA	AB	BB	Total
Equilibrio	p ²	2pq	q ²	1
	(0,78) ²	2(0,78)(0,22)	(0,22) ²	1,000
Esperada	0,61	0,34	0,05	1,00

Al establecer la prueba de Chi cuadrado (Cuadro 6.7) se obtuvo el valor de 0,0534 valor no significativo (n.s), lo que nos indica la similitud entre los valores observados con los esperados por lo tanto hay una influencia directa de los alelos.

Cuadro 6.7. Cálculo de χ^2 (Chi cuadrado), para las UM seleccionadas.

$$\chi^2 = (O-E)^2 / E$$

Genotipo	Observadas	Esperadas	O-E	(O - E)²	(O - E)²/E
AA	0,65	0,61	0,04	0,0016	0,0026
AB	0,26	0,34	-0,08	0,0064	0,0188
BB	0,09	0,05	0,04	0,0016	0,0320
$\chi^2 =$					0,0534 (n.s)

En el Cuadro 6.8, se observa que la población analizada bajo condición de equilibrio genético de Hardy Weinberg con un valor de $\chi^2 = 0,0534$ con 2 grados de libertad demuestra diferencias no significativas. Se observa una diferencia en la distribución de los alelos, la frecuencia del alelo A (0,78) es mayor que la del alelo B (0,22) con una heterocigosidad del 26,47%, resultando una proporción (AA, AB, BB). Estas diferencias se deben que los animales de la raza Brahaman aportaron en su totalidad con el alelo A. No existió cruzamiento al azar lo que es consistente con el hecho de haber usado reproductores heterocigotos. También, en los animales del hato de leche existe un manejo en la reproducción utilizando la técnica inseminación artificial (IA) para mejorar la genética del hato, actualmente el objetivo de la hacienda es mejorar la producción de leche.

Cuadro 6.8. Frecuencias genotípicas y alélicas observados y esperadas en las UM seleccionadas de la Hacienda ESPE “San Antonio”, bajo condición de equilibrio genético de Hardy -Weinberg.

Hacienda ESPE "San Antonio"				
Total de U. de Muestreo				
Genotipo	Observado		Esperado	
	No. U.M	%R	No. U.M	%R
AA	22	0,65	20,7	0,61
AB	9	0,26	11,7	0,34
BB	3	0,09	1,6	0,05
Total:	34	1	34	1
$\chi^2 =$	0,0534 con 2 g.l (n.s)			

Alelos	%
A	0,78
B	0,22
Heterocigosidad	26,471

En el Cuadro 6.9, se comparan las frecuencias alélicas obtenidas en este estudio con otras razas de bovinos (Veli *et al.*, 2004). Se puede observar que las frecuencias encontradas de los animales muestreados de la Hacienda ESPE “San Antonio” están en niveles superiores con respecto a las otras razas de bovinos dedicadas a la producción de leche. Se recomienda que se realice un seguimiento en la progenie de los cruzamientos con animales de la raza Gyr ya que como se puede apreciar en el cuadro tiene una frecuencia para el alelo κ -CN^A de 0,93 ideal para la producción de leche en el trópico. Si se desea mejorar la cantidad de proteína, grasa y sólidos totales se recomienda utilizar los reproductores de la raza Jersey que dispone la hacienda, ya que esta raza tiene una frecuencia para el alelo κ -CN^B de 0,77 ideal para mejorar el rendimiento quesero, demostrado en estudios previos por Giovambattista *et al.* en 1998.

Cuadro 6.9. Frecuencias alélicas de κ -caseína de razas de bovinos.

Raza	Frecuencia alélica		Referencia
	κ -CN ^A	κ -CN ^B	
Animales muestreados en este estudio.	0,78	0,22	Terán y Santillán, 2006
Criollo Huascao	0,64	0,36	Veli <i>et al.</i> , 2004
Criollo Tifllos	0,5	0,5	Veli <i>et al.</i> , 2004
Criollo Argentino	0,647	0,353	Golijow <i>et al.</i> , 1999
Rubia Gallega	0,47	0,53	Viana <i>et al.</i> , 2001
Holstein	0,9	0,1	Viana <i>et al.</i> , 2001
Jersey	0,23	0,77	Malean <i>et al.</i> , 1984; Van Eenennaan y Medrano, 1991; Grosclaude, 1998

Normanda	0,44	0,56	Malean <i>et al.</i> , 1984; Van Eenennaan y Medrano, 1991; Grosclaude, 1998
Gyr	0,93	0,07	Kemenes <i>et al.</i> , 1999
Pantaneiro	0,782	0,218	Lara <i>et al.</i> , 2002
Santa Gertrudis	0,85	0,15	Kemenes <i>et al.</i> , 1999

Fuente: Veli *et al.*, 2004. Modificado. Elaborado: Terán y Santillán, 2006.

Teniendo en cuenta la necesidad de cambiar las proporciones genóticas de la κ -caseína en el hato de leche, este estudio a estandarizado la metodología para ser implementada en sistemas de producción del país, con lo cual se obtuvo resultados similares a los obtenidos por diferentes investigaciones en Chile (Felmer y Butendieck, 1998); Argentina (Giovambattista *et al.*, 2001); Uruguay (Postiglioni *et al.*, 2002); Cuba (Uffo y Martínez, 2002); Perú (Veli *et al.*, 2004); USA (Rincón y Medrano, 2003) y Colombia (López y Vásquez, 2004), con buenos resultados en los programas de selección asistida por marcadores (SAM).

2. Análisis de la Muestra correspondiente de la raza Brahaman.

En el Cuadro 6.10, se presenta los resultados de los genotipos de las UM correspondientes a la raza Brahaman que corresponden a 2 hembras y 5 machos. El análisis demuestra homocigosidad del alelo A, lo que demuestra lo manifestado por López y Vásquez (2004), que el alelo A es más frecuente en las razas Holstein, Friesian, Danés Rojo y Cebú Índico; también esto puede deberse a que se mantiene pureza varietal en el hato. Se recomienda que estos animales entren en programa de investigación para ser utilizados y evaluados su temperamento lechero.

Cuadro 6.10. UM de la raza Brahaman de la Hda. ESPE “San Antonio”.

Ord	Muestra	Identificación	Sexo	Genotipo
1	T53	47-06	M	AA
2	T58	52-06	H	AA
3	T59	53-06	M	AA
4	T63	57-06	M	AA
5	T64	58-06	M	AA
6	T66	60-06	M	AA

7	T67	61-06	H	AA
---	-----	-------	---	----

3. Análisis de la Muestra correspondiente a reproductores dentro del hato lechero

En el Cuadro 6.11, se presenta los resultados del genotipo de los reproductores del hato de leche; en donde, T19 y T75 presentan un genotipo AB, el T69 un genotipo AA recomendado para introducir el alelo A en su progenie y mejorar la producción, T72 y T88 un genotipo BB estas dos UM son de la raza Jersey recomendados para introducir el alelo B que nos indica una presencia mayor de la proteína y mejorar la calidad de la leche.

Cuadro 6.11. Reproductores del hato de leche de la Hda. ESPE “San Antonio”

Ord	Muestra	Identificación	Sexo	Genotipo	Observación
1	T19	707-05	M	AB	Reproductor
2	T69	689-05	M	AA	Reproductor
3	T72	SN	M	BB	Reproductor Jersey
4	T75	1563-06	M	AB	Reproductor
5	T88	563-04	M	BB	Reproductor Jersey

Lo anterior indica que una adecuada selección del genotipo de las proteínas de la leche podría permitir la determinación de las características físicas y químicas de la leche que sean de interés para su procesamiento tecnológico, aumentar considerablemente la cantidad y calidad de la leche. El reto es que los productores se deberán familiarizar con la nueva tecnología y aplicaciones de los marcadores moleculares, para poder permanecer en el mercado tan competitivo como el de la producción láctea (López y Vásquez, 2004).

4. Análisis de hembras productoras de leche

Bajo la discriminación del grupo de animales Brahama que pertenecen al hato de carne y de los machos reproductores dentro del hato lechero; se seleccionaron a las

hembras de las que se disponían los registros de producción de leche, con el fin de establecer las frecuencias alélicas y correlacionarlas con la producción.

En el Cuadro 6.12, se presenta a las UM, correspondiente a vacas productoras de leche con su identificación, su genotipo y la producción ajustada a 305 días en sus 2 últimas lactancias.

Cuadro 6.12. Producción de las Unidades de Muestreo (UM) del hato de leche de la Hda. ESPE “San Antonio”.

Ord	Muestra	Identificación	Sexo	Genotipo	Producción
1	T2	170-00	H	AA	5900
2	T4	1291-97	H	AA	2200
3	T9	666-99	H	AB	2500
4	T15	1178-99	H	AB	2300
5	T21	620-01	H	AA	4550
6	T22	1084-00	H	AA	4500
7	T70	205-00	H	AA	4500
8	T73	29-97	H	AB	3450
9	T77	402-96	H	AA	5010
10	T87	1344-89	H	AA	2700
11	T71	983-96	H	AA	4500
12	T76	30-93	H	AB	3300
13	T78	1308-01	H	AA	3800

14	T82	42-96	H	BB	2350
15	T83	1026-96	H	AA	3600
16	T85	436-97	H	AA	4350
17	T86	1495-00	H	AB	3200
18	T89	240-93	H	AB	2315
19	T90	1444-01	H	AA	4300
20	T91	162-02	H	AB	2250
21	T92	89-99	H	AA	4500

En el Gráfico 6.2, se presenta un histograma de la producción en el cual indica la frecuencias seleccionadas; 5 UM con 2.000 litros de leche, 2 UM con 2.500 litros, 3 UM con 3.000 litros, 2 UM con 3.500 litros, 2 UM con 4.000 litros, 5 UM con 4.500 litros, 1 UM con 5.000 litros y 1 UM con 5.500 litros, con una media de producción de 3.622,6 litros, y una desviación estándar de 1.083,5 litros de leche.

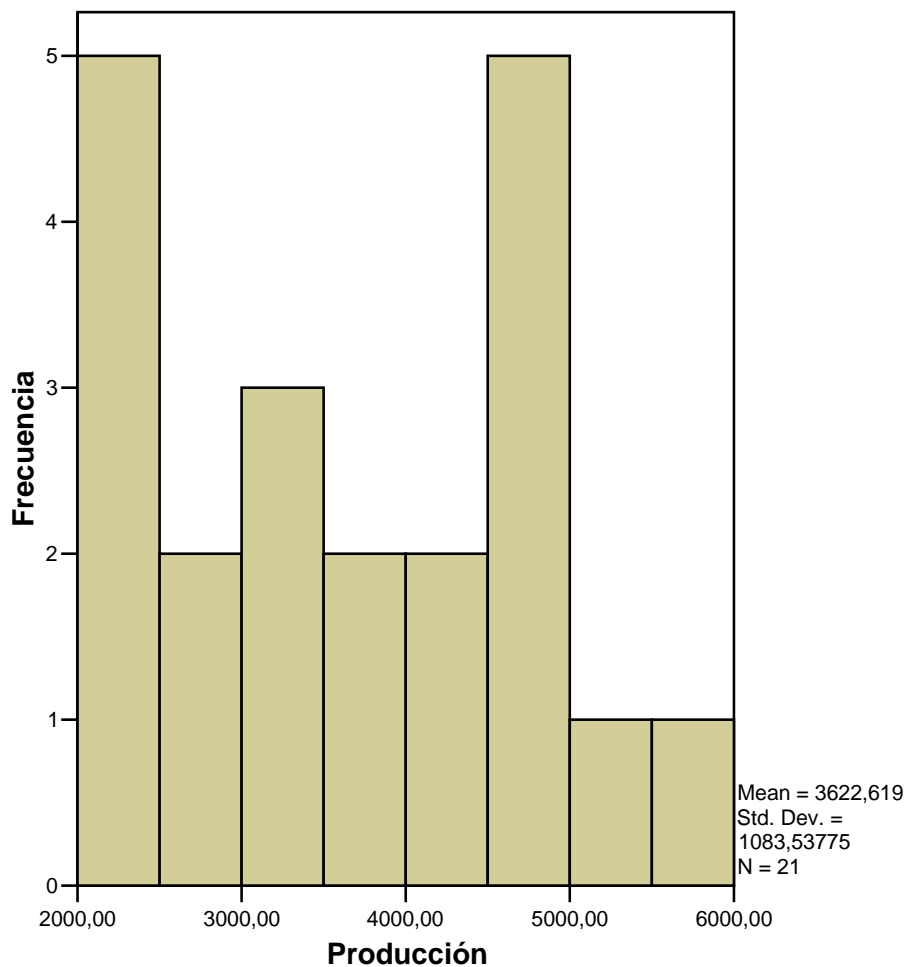


Gráfico 6.2. Histograma de producción de leche de las UM en producción.

d. Análisis de las frecuencias genotípicas

En el Cuadro 6.13, se presentan los resultados de los genotipos encontrados en los animales en producción del hato lechero seleccionados para el proyecto de investigación. Se identificó 13 animales con el genotipo AA, 7 animales con el genotipo AB y 1 animal con el genotipo BB.

Cuadro 6.13. Resultado de los genotipos encontrados en la UM en producción.

Genotipo	U. de Muestreo
AA	13
AB	7
BB	1
Total:	21

Para el análisis estadístico de la variabilidad genética se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas y el equilibrio génico según Hardy-Weinberg, con la prueba de χ^2 (Chi cuadrado). (Cuadros 6.14, 6.15, 6.16 y 6.17).

En el Cuadro 6.14, las frecuencias de D, H y R (AA, AB, BB) no son iguales. En consecuencia, la población no se encuentra en equilibrio y no existe cruzamiento al azar para este locus (Felmer y Butendieck, 1998).

Cuadro 6.14. Cálculo para determinar la frecuencia genotípica observada de las UM en producción.

Genotipo	A1A1	A1B2	B2B2	Total
F. Absoluta	N11	N12	N22	N
F. Relativa	D	H	R	1

Genotipo	AA	AB	BB	Total
F. Absoluta	13	7	1	21
F. Relativa	0,619	0,33	0,05	1,00

Cuadro 6.15. Cálculo para determinar la frecuencia alélica de las UM en producción.

Alelo	A1	B1	Total
F. Absoluta	2 N11 + N12	2 N22 + N12	2 N
F. Relativa	p	q	1

Alelo	A1	B1	Total
F. Absoluta	2(13) + 7	2(1) + 7	2 (21)
	33	9	42
F. Relativa	0,79	0,21	1,00

Cuadro 6.16. Cálculo para determinar la frecuencia genotípica esperada de las UM en producción.

Genotipo	AA	AB	BB	Total
Equilibrio	P^2	$2pq$	q^2	1
	$(0,79)^2$	$2(0,79)(0,21)$	$(0,21)^2$	1,000
Esperada	0,624	0,332	0,04	0,96

Al realizar la prueba de Chi cuadrado (Cuadro 6.17) se obtuvo el valor de 0,00243 valor no significativo (n.s), lo que nos indica la similitud entre los valores observados con los esperados por lo tanto hay una influencia directa de los alelos.

Cuadro 6.17. Cálculo de χ^2 (Chi cuadrado), para las UM en producción.

$$\chi^2 = (O-E)^2 / E$$

Genotipo	Observadas	Esperadas	O-E	(O - E) ²	(O - E) ² /E
AA	0,619	0,624	-0,01	0,0001	0,00016
AB	0,333	0,332	0,0015	0,000002	0,00001
BB	0,05	0,04	0,010	0,0001	0,00227
$\chi^2 =$					0,00243 (n.s)

En el Cuadro 6.18, se observa que la población analizada bajo condición de equilibrio genético de Hardy Weinberg con un valor de $\chi^2 = 0,00243$ con 2 grados de libertad demuestra diferencias no significativas. Se observa una diferencia en la distribución de los alelos, la frecuencia del alelo A (0,79) es mayor que la del alelo B (0,21) con una heterocigosidad del 33,3%, con una proporción de (AA, AB, BB). No existió cruzamiento al azar lo que es consistente con el hecho de haber usado reproductores heterocigotos. Estas diferencias pueden deberse como la anterior en las UM seleccionadas a que existe un manejo en la reproducción utilizando la técnica IA para mejorar la genética del hato.

Cuadro 6.18. Frecuencias genotípicas y alélicas observados y esperadas en las U.M en producción de la Hacienda ESPE “San Antonio” bajo condición de equilibrio genético de Hardy-Weinberg.

Hacienda ESPE "San Antonio"				
Total de U.M en Producción				
Genotipo	Observado		Esperado	
	No. U.M	%R	No. U.M	%R
AA	13	0,62	12,2	0,58
AB	7	0,33	7,0	0,33
BB	1	0,05	0,9	0,04
Total:	21	1	20	1
$\chi^2 =$	0,00526 con 2 g.l (n.s)			
Alelos	%			
A	0,79			
B	0,21			
Heterocigosidad	33,333			

e. Análisis de la producción de leche

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto entre los Genotipos obtenidos y la Producción de leche reportada. Detectándose diferencias estadísticas al nivel del 1% entre los genotipos encontrados. (Cuadro 6.19).

Cuadro 6.19. Análisis de Varianza de la U.M en producción.

ANOVA

Producción

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	Sig.
Genotipos	10954136,447	2	5477068,223	7,870	,004
E. Experimental	12526944,505	18	695941,361		
Total	23481080,952	20			
Promedio (litros)	3622,62				
C. Variación (%)	23,03				

Al comparar los genotipos encontrados con respecto a la producción de leche ajustada a los 305 días mediante la prueba de DMS al 5% (Cuadro 6.20), se determinó que la mayor producción se obtuvo con el genotipo AA y se encuentra ocupando el primer rango con un promedio de 4.185,38 litros correspondiente a 13 animales, mientras que las producciones de los genotipos BB y AB no se diferenciaron estadísticamente y se encuentran ocupando el segundo rango con rendimientos inferiores a los 2.800 litros. Objetivamente se puede apreciar en el Grafico 6.3.

Van Eenennaam y Medrano (1998), demostraron que la leche de los animales con genotipo AB contiene una mayor proporción de κ -CN^B. Esto sugiere que dicho alelo tiene un mayor nivel de expresión con respecto a la variante A en la glándula mamaria de los bovinos. La diferencia de la expresión de los alelos, explicaría las observaciones hechas previamente, que evidencia que la proporción de la κ -caseína en la leche depende del genotipo del animal. Esto explica en la presente investigación que los animales AB se encuentren en el rango de baja producción de leche.

Cuadro 6.20. Producción de leche ajustada a los 305 días para cada uno de los genotipos encontrados DMS al 5%.

Genotipos	Producción de leche (305 días)	Rango
AA	4185,38	a
AB	2759,29	b
BB	2350,00	b

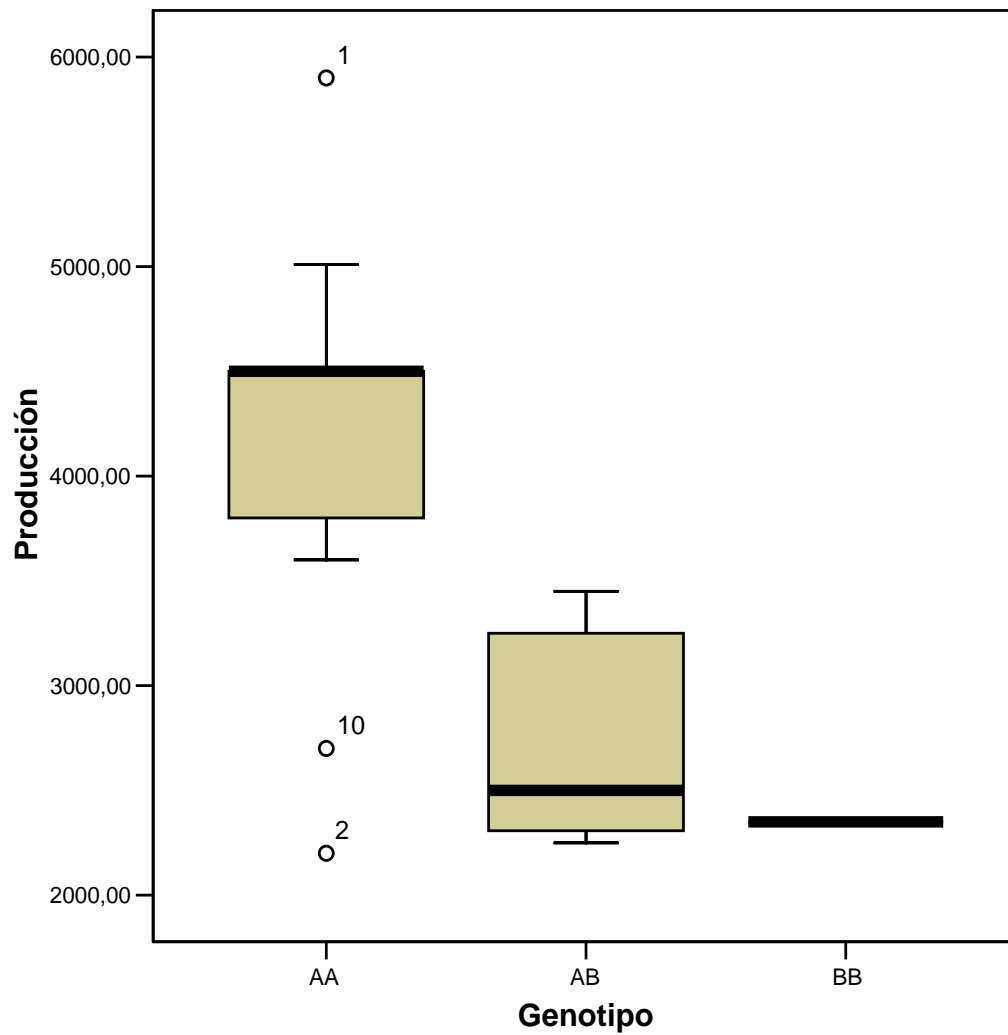


Gráfico 6.3. Rangos de producción obtenidos de los genotipos estudiados.

f. Regresión genotipo-producción de leche

Al establecer el análisis de regresión genotipos-producción, se determinó una significación a nivel del 1% en el efecto lineal de los genotipos sobre la producción (Cuadro 6.21).

Cuadro 6.21. Análisis de varianza de la regresión genotipos-producción.

ANOVA(b)

Fuentes de Variación	Suma de cuadrados	g.l	Cuadrados medios	F	Sig.
Regresión	10377442,653	1	10377442,653	15,047	,001(a)
Residual	13103638,299	19	689665,174		
Total	23481080,952	20			

a Variables predictoras: (Constante), Observaciones

b Variable dependiente: Producción

Coefficientes(a)

Modelo lineal		Coefficients no estandarizados		Coefficients estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
(Constante)		1544,624	565,519		2,731	,013
Observados		4187,898	1079,618	,665	3,879	,001

a Variable dependiente: Producción

La ecuación de regresión lineal fue: con coeficiente de correlación y determinación de $r = 0,67$ y $r^2 = 0,442$ respectivamente (Cuadro 6.22).

Cuadro 6.22. Ecuación de regresión, coeficientes de correlación y determinación.

Ecuación de regresión	C. Correlación	C. Determinación
Y- 1544,624 + 4187,898 X	$r = 0,67$	$r^2 = 0,442$

De estos resultados se desprende que existe un efecto lineal de los genotipos sobre la producción de leche con un coeficiente de correlación de 0,67 y el 44% del efecto genotípico sobre la producción (Cuadro 6.23). Objetivamente se puede apreciar en el Grafico 6.4, genotipo AA (1), genotipo AB (2) y genotipo BB (3).

Cuadro 6.23. Coeficientes de Correlación y Determinación.

Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado
1	,665(a)	,442

a Variables predictoras: (Constante), Observaciones

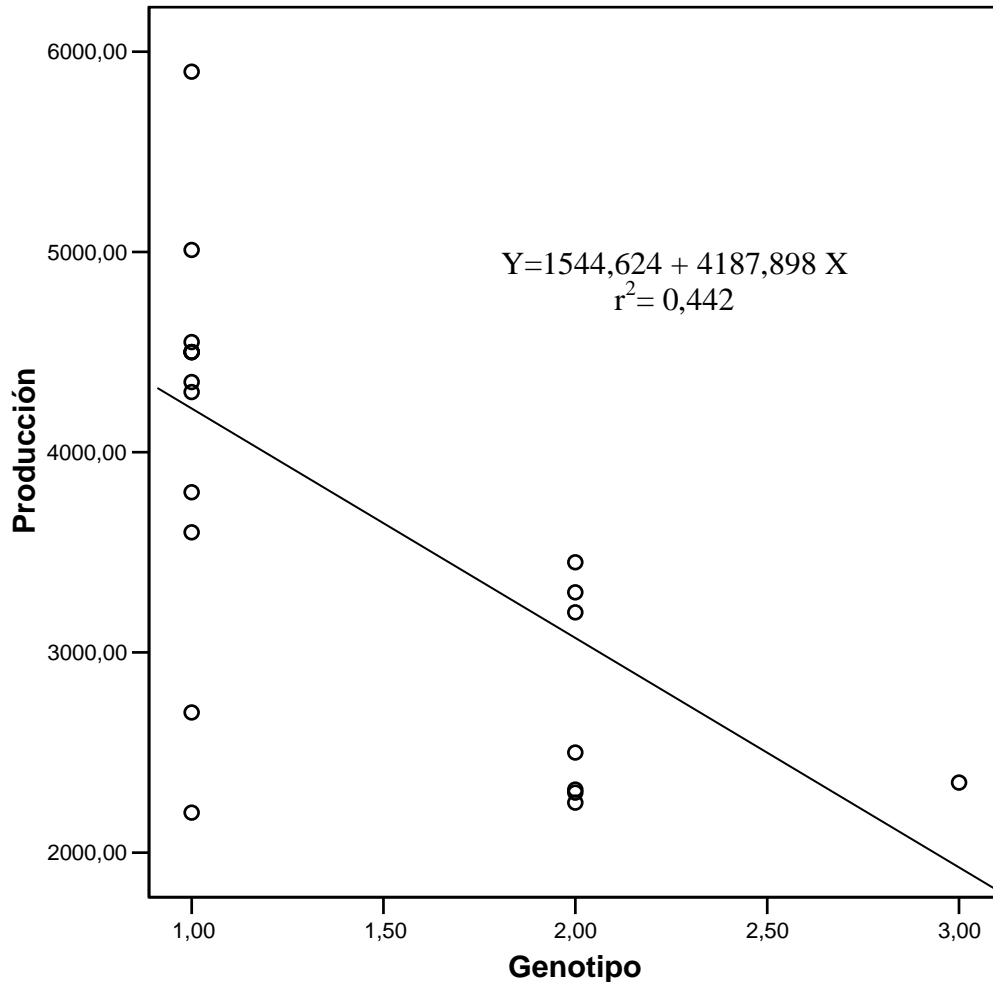


Gráfico 6.4. Regresión Genotipo-Producción.

Giovambattista *et al.*, (1998), manifiesta que en las diferentes razas, no siempre se presentan las mismas asociaciones marcador-QTL. Si se tiene en cuenta que el ligamiento entre el QTL y el marcador genético es incompleto, podría existir en la población diferentes haplotipos marcador-QTL. De este modo, el alelo B podría estar ligado al alelo de alta producción del QTL en algunos animales, mientras que en otros estaría ligado a la variante de baja productividad. Por lo tanto, los efectos estimados del QTL sobre el rasgo cuantitativo se verán sesgados por efecto de la recombinación. Así por ejemplo, Cowan *et al.*, (1992) observaron que el alelo B estaba asociada a una disminución en el porcentaje de grasa. Mientras que, Ron *et al.*, (1994) no encontraron asociaciones entre alelos de la κ -caseína y los caracteres de producción lechera.

Considerando lo anterior, en la presente investigación se encontró una correlación positiva (+), al relacionar genotipo-producción, determinando que los animales

que presentaron genotipo AA de la κ -caseína son los de mayor producción en el hato de la hacienda ESPE “San Antonio”.

Recientes investigaciones en hatos de Holstein Friesian de la Universidad de Iowa, confirman que los genotipos de κ -CN y lactoglobulina (LGB) afectan la composición proteica de la leche y que ambos contribuyen con más del 50% de heredabilidad y más del 25% de la repetibilidad de la proporción de las caseína alfa s1 y kappa de la proteína total de la leche. Del mismo modo el genotipo de la κ -caseína explica el 25,4% de la variancia fenotípica total de la concentración de proteína de la leche, siendo el factor más importante entre otros parámetros tales como número de parto, mes de lactación y efectos ambientales (dieta, mastitis, etc.) (Veli *et al.*, 2004).

Lo anterior plantea la continuación de investigaciones en el futuro para poder comparar los análisis de heredabilidad y repetibilidad en los animales estudiados con los de su progenie.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

1. El uso de técnicas moleculares permitió identificar las variantes alélicas del gen de la κ -caseína, para optimizar los programas de mejoramiento genético en el hato lechero de la Hacienda ESPE “San Antonio” en el trópico ecuatoriano.
2. Se amplificó por PCR un fragmento de 437 pb del gen de la κ -caseína, el cual presenta un polimorfismo en la posición 148 del residuo de asparagina por el residuo de alanina, eliminando un sitio de restricción para la enzima *HindIII* (RFLP) en κ -caseína B.
3. Se visualizaron las variantes alélicas del gen de la κ -caseína, obteniendo para el genotipo AA un fragmento de 437 pb; y, dos fragmentos de 347 y 90 pb, para el

genotipo BB; mientras que para el genotipo AB, tres bandas de 437, 347 y 90 pb respectivamente.

4. Existe un efecto lineal de los genotipos sobre la producción de leche con un coeficiente de correlación alto (0,67) y el 44% del efecto genotípico sobre la producción.
5. Al comparar los genotipos encontrados con respecto a la producción de leche (DMS al 5%), se determinó que la mayor producción se obtuvo con el genotipo AA y se encuentra ocupando el primer rango con un promedio de 4.185,38 litros, mientras que las producciones de los genotipos BB y AB no se diferencian estadísticamente y se encuentran ocupando el segundo rango con rendimientos inferiores a los 2.800 litros.
6. El método de amplificación basado en la PCR, permitió reproducir con rapidez y confianza el fragmento del gen de la κ -caseína utilizando los cebadores CASK, aplicable a todos los bovinos, independiente de la edad, sexo y etapa de lactancia.
7. El tiempo transcurrido desde la extracción de sangre hasta la identificación del genotipo en geles de agarosa ofrece enormes ventajas, comparado con el tiempo que se necesita para evaluar a un animal por métodos convencionales.
8. Este método utiliza la expresión fenotípica como fuente de información de la variabilidad existente, como objetivo y como criterio de selección. Con la identificación de marcadores moleculares asociados a loci que codifican tanto para características cualitativas como para características cuantitativas (QTL), es posible realizar selección asistida por marcadores (SAM).
9. La SAM ofrece una serie de ventajas, entre las que se puede mencionarse la determinación del genotipo directamente sobre el ADN, sin que dicha información se vea afectada por la influencia del ambiente; esto permite mejorar la exactitud de la evaluación genética.
10. La SAM permite obtener información antes que se exprese el fenotipo, o que los reproductores tengan descendencia. Dado que no es necesario esperar datos de comportamiento, permitiendo disminuir el intervalo generacional y reducir los costos de cría, haciendo mejor uso de la variación genética no aditiva.
11. Los productores deberán familiarizarse con la nueva tecnología y aplicaciones de los marcadores moleculares, para poder permanecer en el mercado tan competitivo como es, el de la producción láctea.

CAPÍTULO VIII

RECOMENDACIONES

1. Realizar el seguimiento de los resultados, con los animales de la raza Gyr, ya que tiene una frecuencia para el alelo κ -CN^A de 0,93 ideal para la producción de leche en el trópico. Si se desea mejorar la cantidad de proteína en leche se recomienda utilizar los reproductores de la raza Jersey que dispone la Hda. ESPE “San Antonio”, ya que tiene una frecuencia para el alelo κ -CN^B de 0,77 ideal para mejorar el rendimiento quesero.
2. Considerar a los animales de raza Brahaman en un programa de evaluación de mejoramiento genético para establecer su temperamento lechero y aprovechar su rusticidad en el trópico.
3. Realizar un seguimiento a la progenie del reproductor 689-05 que dispone de un genotipo AA, para confirmar el incremento en la frecuencia alélica κ -CN^A en el hato lechero, aprovechando que este animal está adaptado a las condiciones ambientales del trópico ecuatoriano.
4. Establecer un Programa de mejoramiento genético bovino que incluya la utilización de los marcadores moleculares como una herramienta para la selección asistida de genotipos promisorios en la producción de leche y carne, como parte de un trabajo institucional de la Escuela Politécnica del Ejército, el cual deberá contemplar la concreción de líneas de investigación específicas las cuales pueden ser:
 - a. Genotipificar el semen de los reproductores que venden las casas comerciales.
 - b. Evaluar el gen de la κ -CN para medir el efecto del incremento del peso al destete en los animales de engorde.

- c. Evaluar la heredabilidad del gen de la κ -CN en la descendencia de los animales altos productores.
- d. Determinación del sexo y genotipificación del gen de la κ -CN en embriones bovinos.
- e. Evaluar la distribución diferencial de las variantes alélicas de las proteínas lácteas: β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina.
- f. Evaluación de la variabilidad del gen de la κ -CN en bovinos criollos.

CAPÍTULO X

SUMMARY

Milk of cows that carries the B allele of κ -casein gene display superior yield in cheese production, compared with that obtained in milk of cows that carrying the A allele, it is linked with the mayor milk production.

Blood samples of 34 cows of ESPE "San Antonio" Farm located at tropical Ecuadorian section were studied. A 437 pb fragment of the genomic bovine κ -casein gene was amplified by PCR. Their genotypes were determined for κ -casein by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified DNA. This shows a polymorphism at position 148 of the residue of asparagina for residue of alanina .It delete a restriction point for *HindIII* (RFLP) of κ -casein B. The allele's variants of κ -CN^A y κ -CN^B gene were determined. Thus, digests of alleles A yielded 437pb and alleles B resulted in 374pb and 90pb; and genotype AB resulted in 437pb, 347pb and 90pb.

The Hardy – Weinberg equilibrium turned out to be not significant ($\chi^2 = 0,0534$; 2 g.l). The frequency of allele A (0,78) was higher than allele B (0,22) and the average of heterozygote of 26,47%. There were high correlations (0,67) and 44% of genetic effect above milk production, the comparison of the results with milk production showed a high

significance between milk productions with AA genotype. There were not significance between BB and AB genotype, they had lower rank production.

The challenge is to change the genotypic proportions of these characteristics with the use of Markers Assisted Selection (MAS) of cow's milk of tropical section of Ecuador and it be possible to work with animals with the better quality and quantitative characteristic for milk production and to reduce the interval generation and cost for calf; this makes a better use of no additive variation, with the objective of less and middle farmers can get the best results of their progenies of cows for better production level and competitive of the country.

Key words: κ -casein, PCR-RFLP, genotype, MAS

CAPÍTULO XII

BIBLIOGRAFIA

1. ACCES GENE BANK. 2006. No. X.14908 Bovine Gene for kappa-caseina exons 3-5. URL. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=180>.

Obtenido : 12 jun 2006

2. [ALEXANDER, LJ.](#) [STEWART, AF.](#) [MACKINLAY, AG.](#) [KAPELINSKAYA, T.](#) [TKACH, T](#) y [GORODETSKY, S.](#) 1988. Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. PubMed. 3208764.
3. AGSO. 2005. II CONGRESO REGIONAL DE LECHERIA DE ALTURA. Escuela Politécnica Nacional. 21-23 noviembre. Quito-Ecuador.
4. AMGEN 2004. Biotecnología para la Salud. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR. España. Disponible en: <http://www.biotec.amgen.es/cgi-bin/wdbcgi.exe>. Obtenido: 20 oct 2004.
5. ARRKIS. 2004. Cadena de Reacción de la Polimerasa. España. Disponible en: <http://www.arrakis.es/~ibrabida/vigpqr.html>. Obtenido: 30 sep 2004.
6. AUSUBEL F. BRENT R. KINGSTON R. MOORE. D. SEIDMAN J. SMITH J. et al. 1997. Short Protocols in Molecular Biology. Third Edition. Editorial Wiley. Canadá. C2. C3. C7. C9. C15, pag 1-5. C16.
7. BERKELMAN, T. y STENSTEDT, T. 1998. Electrophoresis using immobilized pH gradients. Amersham Pharmacia Biotech Inc. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/electroforesis.html>. Obtenido: 07 jun 2006.
8. BERNAL, A. 2001. Background: Genética Molecular para el inventario y la caracterización de la biodiversidad. Preparado por la Unidad de Biotecnología del CIAT.
9. BIOMODEL, 2005. Geles de agarosa. Disponible en: <http://www.biomodel.uah.es/biomodel-misc/anim/elfo/electrof.html>. Obtenido: 19-Jul-2006.
10. BROCHU, E; DUMAIS R; JULIEN, J; NADEAU, J; RIEL, R. 1991. Dairy Science and Tecnology. Principles and applications. Ciencia y Tecnología de la leche. Principios y aplicaciones. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza – España. Pag. 1 – 33.
11. CADENA, S. 2004. El Comercio, Quito. Los Gremios Ganaderos Informan al País. Publicado en el mes de Junio. Ecuador.
12. CIENCIA AL DÍA. 2005. Glosario. Disponible en: <http://www.ciencia.cl/CienciaALDia/volumen1.html>. Obtenido: 7 nov 2005.

13. CUNNINGHAM, I y ENRIQUE, A. 2000. Optimización de Rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de la Quesería. Organización de los Estados Americanos OEA. México. C 1; 345 ps.
14. CURTIS, H; BARNES, N. 2001. Biología. Sexta edición. Madrid, España, Editorial Médica Panamericana S.A. p. C16.417-420.
15. DAMIANI G., BUDELLI E., FLORIO S., CAROLI A., PAGNACCO G. 2000. Polymorphism within sine BOV-A2 of k-casein and steroid 21-hydroxylase in some bovine breeds. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, 145-148.
16. DEBELJAK, M; SUSNIK, S; MARINSEK-LOGAR, R; MEDRANO, J.F; DOVC, P. 2000. Allelic differences in bovine kappa-casein gene wich may regulate gene expression. *Pflugers Arch*, 439(3 Suppl):R4-6.
17. DIAZ G. 2005. Marcadores Moleculares. Disponible en: <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS49/marcadores.html>. Obtenido: 12 may 2005.
18. ENTRALA, C. 2000. Técnicas de Análisis del ADN en Genética Forense. Universidad de Granada. Laboratorio de ADN Forense. España.
19. FELMER R. BUTENDIECK M. 1998. "Frecuencia alélica del gen de la k-caseína bovina en un rebaño Frisón Negro Chileno". Arch. Med. Vet. ISSN 0301-732X. Centro Regional de Investigación-Carillanca, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA. Temuco, Chile.
20. FERREIRA, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética (2nd ed.) Embrapa.
21. GIOVAMBATTISTA G., RIPOLI M., PERAL-GARCÍA P., DE LÚEA J., DULOUT F. 1998. Estado actual del mapeo de QTLs para producción lechera. ISSN 0304-8802 *versión impresa*, Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA), La Plata, Argentina.
22. GIOVAMBATTISTA, G; RIPOLI, M; PERAL-GARCÍA, P; AND BOUZAT, J. 2001. Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinian Creole cattle. *Animal Genetics*. 32: 240-247.
23. HALEY C. 1995. Livestock QTLs-brinding home the beacon? TIG p. C12.488-C12.492.
24. HERVERG, J Y BARCIA-MACAY, M. 2004. Enzima de Restricción de la clase II. Universidad Católica de Louvain, Facultad de Medicina. Cochabamba,

Bolivia. Disponible en:
<http://www.icampus.ucl.ac.be/SBIM2520/document/genemol/biomolespa/Enzimas/enzimas-de-restricc.html> Obtenido: 18 jun 2005.

25. HOWARD HUGUES. 2006. Tema desarrollado a partir de las animaciones de: The Virtual Bacterial ID Laboratory. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/identificacion/2.htm> . Obtenido: 15 jun 2006.
26. KAMINSKI, S. 1996. Dde I RFLP at the 5' region of bovine kappa-casein gene. *Journal of Applied Genetics*, 37(2), 173-178
27. KLAUZINSKA, M; SIADKOWSKA, E; GROSHOWSKA, R; ZWIERZCHOWSKI, L; ZURKOWSKI, M. 2001. Polymorphism of molecular-genetic systems in the Polish red cattle. *Tsitol. Genet.* 35(1):58-60.
28. LE THI, T. LUU QUANG, M. NGUYEN VAN, H. PHAN, L. TRAN, T. NGUYEN, B. AND NGUYEN, V. 2004. The polymorphism of the kappa-casein gene fragment of some Vietnamese *Bos taurus*. NCBI. 52745109.
29. LEVÈZIEL, H; RODELLAR, C; LEROUX, C; PEPIN, L; GROHS, C; VAIMAN, D; MAHÉ, M. H; MARTIN, P; GROSCLAUDE, F. 1994. A microsatellite within the bovine κ -casein gene reveals a polymorphism correlating strongly with polymorphisms previously describes at the protein as well as the DNA level. *Animal. Genetics*, 25:223-228.
30. LIEN, S; ROGNE, S. 1993. Bovine casein haplotypes: numbers, frequencies and applicability as genetic markers. *Anim Genet.* , 24:373-376.
31. LOPEZ, E; VAZQUEZ, N. 2004. Determinación del sexo y genotipificación del gen de la k-caseína en embriones bovinos. *Revista colombiana de Ciencias Pecuarias.* v. 17. p. C3.231-C3.240.
32. MAHÉ, M. F; MIRANDA, G ; QUEVAL, R ; BADO, A ; ZAFINDRAJOANA, P : GROSCALUDE, F. 1999. Genetic polymorphism of milk proteins in African *Bos taurus* and *Bos indicus* populations. Characterization of variants α_{s1} -Cn H and k-Cn J. *Genetics, Selection and Evolution*, 31:239-53.
33. MEDRANO J. AGUILAR – CORDOVA E. 1990. “Genotipado del loci de bovinos para el gen de la κ -Cn siguiendo la amplificación de la secuencia de ADN”. *BioTechnology.* p. C8: 144-146.

34. MERCIER, J. C; VILOTTE, J. L. , PROVOT, C. 1990. Structure and function of milk protein genes. In: H. Gelderman (ed): *Genome analysis in domestic animals*. VCH, Weinheim Germany.
35. MERCIER, J.C y VILLOTE, J. 1993. Structure and function of milk protein genes. *J Dairy Sci.* 76:3079-3098.
36. MIRANDA G., ANGLADE P., MAHÉ M.F., ERHARDT G. 1993. Biochemical characterization of the bovine genetic k-casein C and E variants. "*Animal Genetics*", 24, 27-31.
37. MUÑOZ G. 2004. Enzimas de Restricción. Disponible en: http://ejb.ucv.cl/gmunoz/genweb/genetica/frame/textos/4_2enzim_restric.htm
Obtenido: 9 jun 2005.
38. [Ng-KWAI-HANG KF, ZADWORNY D, HAYES JF, KUHNLEIN U.](#) 1991. Identification of kappa-casein genotype in Holstein sires: a comparison between analysis of milk samples from daughters and direct analysis of semen samples from sires by polymerase chain reaction. *J Dairy Sci.*;74(8):2410-5.
39. ORVIS KATRYN. 2005. Glosario. Universidad de Purdue. Disponible en: <http://www.entm.purdue.edu/extensiongenomics/GAME/spanish/glossary.html> . Obtenido:19 ago 2006
40. OSTA, R; GARCÍA-MURO, E.; ZARAGOZA, P.; RODELLAR, C.; ZARAZAGA, I. 1993. Milk protein genotyping in bovine embryos using PCR. 9^{na} Reunion AETE-Lyon, 10-11, Septiembre.
41. POSTIGLIONI, A; RINCON, G; BARRERA, J; KELLY, L; LLAMBI, S; TRUJILLO, J. 2000. Differential Distribution of allelic variants of milk proteins (k-Casein, beta-lactoglobulin, alfa-lactoalbumin) in Uruguayan bovine breeds. Uruguay.
42. POSTIGLIONI, A; RINCON, G; KELLY, L; LLAMBI, S. 2002. Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. Análisis con Marcadores Moleculares. *Archivo zootec* 51. Zaragoza, España. p 195-202.
43. PRINZENBERG, EM; KRAUSE, I; ERHARDT, G. 1999. SSCP analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A1). *Anim. Biotechnol.* 10(1-2):49-62.
44. RAMÍREZ, N; MÉNDEZ, A; COCOTLE, B; ARENAS, J. 2006. Reacción en Cadena de Polimerasa. Departamento de Patología experimental Facultad de

- Medicina U.V. Disponible en:
http://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica%20vol3_num1/vol3_num1/articulos/reaccion_cad_polimerasa.html. Obtenido: 3 abr 2006.
45. RINCÓN G. MEDRANO F. 2003. "Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR". Department of Animal Science, University of California, Dawis, CA, USA. p. 65.
46. RIPOLI, M; CORVA, P; ANTONINI, A; de LUCA, J; ROJAS, F; DULOUT, F; GIOVAMBATTISTA, G. 2003. Asociación entre cinco genes candidatos y producción de leche en la raza criolla Saavedreña. Arch. Zootec. 52: 89-92.
47. RIVERA, O y MALDONADO, I. 2005. Enzimas de Restricción y Electroforesis de DNA. Disponible en:
<http://www.uprm.edu/biology/cursos/biologiageneral/EnzimasDNA.htm>
Obtenido el 18 Jun 2005.
48. RODRIGUEZ, M. 2000. Guía de Laboratorio Molecular. Cátedra de Técnicas Especiales de Laboratorio. Universidad Libre Seccional de Barranquilla. Colombia. Disponible en:
<http://www.uniblibrebaq.edu.co/ubaq/Mis%20Webs/PCR.htm>. Obtenido: 25 may 2006.
49. ROCHA, P y BERNAL, A. 2001. Background: Genética molecular para el inventario y la caracterización de la biodiversidad. Enzimas de Restricción. CIAT. Unidad de Biotecnología. Costa Rica. Ps 55.
50. [SCHLIEBEN S, ERHARDT G, SENFT, B.](#) 1991. Genotyping of bovine kappa-casein (kappa-CNA, kappa-CNB, kappa-CNC, kappa-CNE) following DNA sequence amplification and direct sequencing of kappa-CNE PCR product. *Anim Genet.*; 22(4):333-42.
51. SCHLIMME E. BUCHHEIM W. 2002. "La Leche y sus Componentes". segunda edición. Zaragoza - España. Editorial Acribia S.A. p. C1.1-4. C3.
52. SICA-MAG, 2000. III Censo Nacional Agropecuario. Disponible en:
<http://www.sica.gov.ec>. Obtenido: 15 may 2004.
53. SMITH, C. WOOD, E. 1998. Biología Molecular y Biotecnología. Primera Edición. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana S.A. Wilmington, Delaware, EUA. P. C1.1-17. C7.135-155. C9.185-211.
54. SOLOMON, O. BERG, L. MARTIN, D. 2001. Biología. Quinta Edición. Editorial. McGraw-Hill Interamericana. México. C14. p 308-323.

55. SORRELLS M.E. 1998. Marker Assisted Selection: Is it Practical. In: International Workshop on the Application of Biotechnologies to Wheat Breeding. Eds: Dr. Mohan Kolhi and INIA La Estancuela.
56. STUBER C.W, M. POLACCO, AND M.L. SENIOR. 1999. Synergy of Empirical Breeding, Marker - Assisted Selection, and Genomics to Increase Crop Yield Potential. *Crop Sci.* 39:1571-1583.
57. THREADGILL, D.W; y WOMACK, J. E. 1990. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucl. Acid Research*, 18, 6935-6942.
58. TEXTOS CIENTIFICOS, "Separación de Biomoléculas", 2004. Disponible en: <http://www.textoscientificos.com/quimica/coloides>. Obtenido: 15 Jul 2006.
59. UFFO O. 2000. "Aplicación de Marcadores Moleculares para el estudio de la Biodiversidad del ganado bovino cubano". CENSA, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana, Cuba. 145 p.
60. UFFO, O y MARTINEZ, S. 2002. Amplificación por PCR de los genes que codifican para la alfa lactoalbúmina, la beta lactoglobulina y la kappa caseína de una vaca alta productora de leche y dos de sus descendientes e identificación de las variantes alélicas por RFLP. *Revista Salud Animal*, Vol 24, No. 1. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. CENSA. La Habana, Cuba. p 22-26.
61. VAN EENENNAAM A. Y MEDRANO J. 1998. "Differences in allelic protein expresión in milk of heterozygous κ -Cn cows". *Journal Dairy Science*. p. C74.1491-1496.
62. VÁZQUEZ, S. SALTOS, N. 2005. "Ecuador su Realidad". Décima tercera edición. Quito, Ecuador, Editorial Fundación de Investigación y Promoción Social "José Peralta". . 190 p.
63. VELEZ M. HINCAPIÉ J. MATAMOROS I. 2000. "Producción de Ganado Lechero en el Trópico". 3ra edición. Zamorano Academic Press. p. 1-5, 12-20, 99-126, 147-152.
64. VELI, E; RIVAS, E; RIVAS, V; VERASTEGUI, M; 2004. Evaluación de la variabilidad de genes de kappa caseína en poblaciones de bovinos criollos de Tífillos y Huaschao, Región Ancash. Instituto Nacional de Investigación Agraria, INIA. Perú.
65. WOMACK J. 1998. A gene map of the cow. *Journal of heredity*. p. C, 77.2-7.

66. WIKIPEDIA. (2005). Electroforesis en geles. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Electroforesis_en_gel, Obtenido: 15 Jul 2006.

CAPÍTULO IX

RESUMEN

La leche de las vacas que portan el alelo B del gen de la κ -caseína presenta un rendimiento superior en la producción de quesos, comparado con la leche de las vacas que portan el alelo A, correlacionado con una mayor producción.

Las muestras de sangre se recolectaron de 34 bovinos seleccionados de la Hacienda ESPE “San Antonio” en el trópico ecuatoriano, para identificar el gen de la κ -caseína por técnicas moleculares. Se amplificó por PCR un fragmento de 437 pb del gen, el cual presenta un polimorfismo en la posición 148 del residuo de asparagina por el residuo de alanina, lo cual elimina un sitio de restricción para la enzima *HindIII* (RFLP) en κ -caseína B, donde se determinaron las variantes alélicas; para el alelo A se obtuvo un fragmento de 437 pb; y, dos fragmentos de 347 y 90 pb, para el alelo B; mientras que para el genotipo AB, tres bandas de 437, 347 y 90 pb respectivamente.

La población se analizó bajo el equilibrio genético de Hardy-Weinberg, demuestra diferencias no significativas ($\chi^2 = 0,0534$; 2 g.l). Se observó una diferencia en la distribución de los alelos, la frecuencia del alelo A (0,78) es mayor que la del alelo B (0,22) con una heterocigosidad del 26,47%. Se obtuvo una alta correlación (0,67) y el 44% del efecto genotípico sobre la producción, determinándose que la mayor producción se obtuvo con el genotipo AA, mientras que la producción de los genotipos BB y AB no se diferenciaron estadísticamente mostrando un rango con rendimientos inferiores.

Lo anterior plantea el reto de cambiar las proporciones genotípicas de esta característica por medio de la Selección Asistida por Marcadores (SAM) en los hatos de leche del trópico ecuatoriano, y poder contar con animales con características especiales de

producción lechera tanto en calidad como en cantidad, así mismo disminuir el intervalo generacional y reducir el costo de cría; haciendo mejor uso de la variación genética no aditiva, con la finalidad que pequeños y medianos productores puedan potencializar estas características en las progenies de sus hatos para mejorar los niveles de productividad y competitividad del país.

Palabras clave: κ -caseína, PCR-RFLP, genotipo, SAM.

CAPÍTULO XI

GLOSARIO

Adenina (A) - una base nitrogenada, un miembro del par de bases AT (adenina-timina).

ADN (ácido desoxiribonucleico) - la molécula que codifica la información genética. El ADN es una molécula constituida por dos cadenas (doble-hebra) que se mantienen unidas por enlaces débiles entre los pares de nucleótidos. Los cuatro nucleótidos en el ADN contienen las bases: (A) adenina, (G) guanina, (C) citosina y (T) timina. En la naturaleza, los pares de bases se forman solamente entre A y T, y entre G y C; así la secuencia de cada cadena (hebra) se puede deducir a partir de la secuencia de su pareja.

ADN complementario (ADNc) - El ADN sintetizado, a partir de un modelo de ARN, por una enzima transcriptasa reversa.

ADN o ARN polimerasa - enzima que cataliza la síntesis de ácidos nucleicos a partir de un molde o templado de ácido nucleico ya existente, ensamblando los ribonucleótidos del ARN o los desoxiribonucleótidos del ADN.

Agarosa - es un producto obtenido de una alga marina (sobre todo las algas rojas), que cuando se mezcla con agua y se hierve se vuelve gelatinoso, y se vuelve sólido cuando se enfría.

Alelo - Cada una de las formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus; de cada padre, se hereda un solo alelo por cada locus (e.g., en un locus para el color de los ojos, el alelo puede resultar en ojos azules o marrones).

Aminoácidos - elementos de construcción de las proteínas. Hay 20 tipos diferentes de aminoácidos. Una proteína consiste en una secuencia específica de aminoácidos. Los aminoácidos son los elementos de construcción de los péptidos y de las proteínas.

ARN (ácido ribonucleico) - un producto químico que se encuentra en el núcleo y en el citoplasma de las células; desempeña un papel importante en la síntesis de proteínas y otras actividades químicas de la célula. La estructura del ARN es similar a la del ADN. Hay varias clases de moléculas de ARN, incluyendo el ARN mensajero, el ARN de transferencia, el ARN ribosomal, y otros ARN pequeños, cada uno sirve para un propósito diferente.

ARN Mensajero (ARNm) - el ARN que sirve como molde o templado para la síntesis de proteínas.

ARN de transferencia (ARNt) - una clase de ARN que tiene estructuras con secuencias de nucleótidos cifradas en tripletes, que son complementarias a los tripletes de nucleótidos de las secuencias codificadoras del ARNm. El papel del ARN de transferencia en la síntesis de proteínas es unirse a los aminoácidos y transferirlos a los ribosomas, donde se ensamblan las proteínas según el código genético del ARNm.

Base - Una de las moléculas que forman las moléculas del ADN y del ARN.

Biología molecular - el estudio de la estructura, función, composición de moléculas biológicas importantes.

Biotecnología - un sistema de técnicas biológicas desarrolladas a través de la investigación básica, y que son aplicadas en la investigación y en el desarrollo de un producto. En particular, la biotecnología se refiere al ADN recombinante, la fusión celular, y las nuevas técnicas de bioprocesamiento que se usan en la industria.

Código genético - la secuencia de nucleótidos, cifrada en los tripletes (codones) a lo largo del ARNm, que determina la secuencia de aminoácidos en la síntesis de proteínas. La

secuencia del ADN se puede utilizar para predecir la secuencia del ARNm, y el código genético se puede utilizar a su vez para predecir la secuencia de aminoácidos.

Codominancia - la situación en la cual se expresan dos alelos diferentes para una característica genética.

Desoxiribosa - un tipo de azúcar que es uno de los componentes del ADN (ácido desoxiribonucleico).

Diploide - un sistema completo de material genético que consiste en los cromosomas emparejados, uno de cada padre. La mayoría de las células de los animales, excepto los gametos, tienen un sistema diploide de cromosomas. El genoma bovino diploide tiene 62 cromosomas.

Doble hélice - Es la estructura de escalera en espiral que se forma entre dos hebras de ADN cuando los nucleótidos complementarios en cada hebra se unen mediante enlaces.

Dominante - un alelo que se expresa casi siempre, incluso si solamente una copia está presente. Vea también: gen, genoma.

Electroforesis - un método para separar las moléculas grandes (tales como fragmentos o proteínas de ADN) de una mezcla de moléculas similares. El medio que contiene la mezcla, se expone a una corriente eléctrica y cada clase de molécula viaja (se mueve) a través del medio a una velocidad diferente, dependiendo de su carga eléctrica y tamaño. Los geles de agarosa y de acrilamida son los medios usados normalmente para la electroforesis de proteínas y de ácidos nucleicos.

Enzima - una proteína que actúa como un catalizador, aumentando la velocidad a la que ocurre una reacción bioquímica, pero no cambia la dirección o la composición de la reacción.

Eucariota - célula u organismo que posee un núcleo verdadero (discreto) rodeado por una membrana, y otros compartimientos subcelulares bien desarrollados. Todos los organismos excepto los virus, las bacterias y las algas azules y verdes son eucariotas.

Exon - la región de un gen que codifica para la síntesis de las proteínas. Donde existe más de un exon para un gen dado, los exones se empalman y se representan en el ARN mensajero (ARNm) final.

Gel de agarosa - un gel hecho de agarosa, proporciona una base sólida para cargar y correr las muestras de ADN y ARN.

Gen - la unidad física y funcional fundamental de la herencia. Un gen es una secuencia de nucleótidos situados en una posición específica respecto a un cromosoma particular que codifica un producto con una función específica. (Es decir, una proteína o una molécula de ARN). Un gen es un segmento de ADN que codifica la expresión de una proteína específica, que representa una característica morfológica determinada. Dicho de manera sencilla, un gen contiene un código que determina el color de los ojos, tamaño, cantidad de grasa, producción de leche, etc..., en un animal, o, velocidad de crecimiento, capacidad fotosintética, calidad de frutos, etc., en un vegetal.

Genoma - todo el material genético en los cromosomas de un organismo particular; generalmente, su tamaño está dado como el número total de sus pares de bases.

Genómica - ciencia dedicada al estudio de la secuencia, estructura y función del genoma.

Guanina (G) - una base nitrogenada, un miembro del par de bases GC (Guanina y Citosina) en el ADN. Vea también: par de bases, nucleótido.

Haploide - un solo sistema de cromosomas (la mitad del sistema completo de material genético) presente en las células de óvulos y de espermatozoides de animales, y en las células de óvulos y de polen de las plantas. Los seres humanos tienen 23 cromosomas en sus células reproductoras.

Ingeniería genética - proceso que consiste en alterar el material genético de células u organismos para permitirles hacer sustancias nuevas o realizar nuevas funciones.

Intron - una región no codificadora de un gen, que se transcribe, pero más adelante se elimina, y por lo tanto no se representa en el ARNm final.

Kilobase (kb) - unidad de longitud usada para medir fragmentos del ADN que es igual a 1000 nucleótidos.

Ligasa - la enzima que ayuda a ensamblar dos extremos de ADN (pueden ser los extremos de una o más moléculas de ADN).

Mapa genético - hace posible la determinación de las posiciones relativas de los genes en una molécula de ADN (cromosoma o plásmido) y de la distancia, en unidades de acoplamiento o unidades físicas, entre ellos.

Nucleótido - una subunidad del ADN o del ARN que consiste en una base nitrogenada (adenina, guanina, timina, o citosina en el ADN; adenina, guanina, uracilo, o citosina en el ARN), una molécula del fosfato, y una molécula del azúcar (desoxiribosa en el ADN y la ribosa en el ARN). Los millares de nucleótidos se unen para formar una molécula de ADN o de ARN. Vea también: ADN, par de bases, y ARN.

Núcleo - la estructura central de la célula que contiene los cromosomas.

Par de bases (pb) - Dos bases nitrogenadas (adenina y timina o guanina y citosina) unidas por enlaces débiles. Los enlaces entre los pares de bases, mantienen unidas las dos hebras de ADN en forma de doble hélice.

Proteína - una molécula grande compuesta por una o más cadenas de aminoácidos en un orden específico; el orden es determinado por la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la proteína. Las proteínas se requieren para la estructura, la función, y la regulación de las células, de los tejidos, y de los órganos del cuerpo; y cada proteína tiene funciones únicas. Ejemplos de proteínas son hormonas, enzimas, y anticuerpos.

Replicación del ADN - el uso del ADN existente como molde (templado) para la síntesis de una nueva cadena (hebra) de ADN. En seres humanos y otros eucariotas, el proceso de la replicación ocurre en el núcleo de la célula.

Ribosa - el azúcar de 5 carbonos que sirve como un componente del ARN.

Secuencia complementaria - la secuencia de bases acidonucléicas que puede formar una estructura de doble-hebra "double stranded" con otro fragmento de ADN siguiendo las reglas de emparejamiento de las bases (A empareja con T y C con G). La secuencia complementaria de GTAC por ejemplo, es CATG. Citosina (C) una base nitrogenada, un miembro del par de bases GC (Guanina y Citosina) en el ADN. Secuencia de bases - el

orden de nucleótidos (base+azúcar+grupo fosfato) en una molécula de ADN; determina la estructura de las proteínas codificadas por ese ADN.

Secuencia de bases - El orden de las bases nucleótidas en la molécula de ADN; determina la estructura de las proteínas codificadas por ese ADN.

Secuenciar - determinar el orden de los nucleótidos (la secuencia de bases) en una molécula de ADN o de ARN o el orden de aminoácidos en una proteína.

Timina (T) - una base nitrogenada, un miembro del par de bases AT(adenina-timina).