

Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión

J. A. Aranguren-Méndez¹, R. Román-Bravo¹, W. Isea¹, Y. Villasmil¹, y J. Jordana²

Facultad de Ciencias Veterinarias, La Universidad del Zulia. Apartado 15252, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review

ABSTRACT. The science of genetics has been revolutionized in recent years by the techniques of molecular biology, which make it possible to elucidate complex physiological functions at the gene level: especially after discovery of the Polymerase Chain Reaction (PCR), which enabled studying and measuring genetic variability at the molecular level. The utilization of molecular markers of the microsatellite type is especially noteworthy in this regard, because of the particular intrinsic properties which make them the markers of choice for both basic genetic studies and animal improvement. The most important advances achieved in genetics based on information provided by these markers have been analysis of population genetics, creation of the most sophisticated gene maps, and detection of important genes. Measurement of DNA polymorphism by means of these genetic markers in organisms with complex genomes, has made possible the mapping, manipulation and cloning of genes associated with characters of biological interest. This article reviews some of the practical uses derived from identification and analysis of DNA polymorphism, especially those related to studies based on microsatellite-type markers.

Key words: Microsatellite, DNA, polymorphism, conservation

© 2005 ALPA. Todos los derechos reservados

Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2005. 13(1): 1-6

RESUMEN. La genética ha sido revolucionada en los últimos años por las técnicas de biología molecular, haciendo posible dilucidar complejas funciones fisiológicas a nivel del gen. En especial y luego del descubrimiento de la PCR, la cual ha permitido el estudio y la medición de la variabilidad genética a nivel molecular; así podemos citar la utilización de los marcadores moleculares del tipo microsatélite, los cuales debido a sus particulares propiedades intrínsecas, se han convertido en los marcadores de elección para estudios tanto de genética básica como de la mejora animal. Desde los análisis de genética poblacional, seguidos de las creaciones de los más sofisticados mapas genéticos hasta la detección de genes importantes, han sido las principales incursiones realizadas por los genetistas a partir de la información aportada por estos marcadores. La medición del polimorfismo del ADN, mediante estos marcadores genéticos en organismos con genomas complejos, ha hecho posible además mapeos, manipulación y clonación de genes asociados con caracteres biológicos de interés. En este artículo se plasman algunas de las utilidades prácticas de la identificación y análisis del polimorfismo del ADN, especialmente lo referido al estudio mediante los marcadores del tipo de microsatélite.

Palabras clave: Microsatélite, ADN, polimorfismo, conservación.

Introducción

En genética, tanto desde el punto de vista de la mejora como de la conservación, el principal objetivo que se persigue es estudiar, determinar y medir la variación existente, entre y dentro de los individuos

de una población.

El reciente desarrollo de la biología molecular y las nuevas herramientas estadísticas han permitido la posibilidad de identificar y utilizar esa variación genómica para la mejora del ganado. Desde el punto de vista molecular, esta variación, también denomi-

Recibido Octubre 21, 2003. Aceptado: Diciembre 11, 2004

¹ Enviar correspondencia a E-mail: atilioaranguren@icnet.com.ve

² Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra 08193. Barcelona, España. E-mail: Jordi.Jordana@uab.es

nada «polimorfismo» derivada de cambios espontáneos en el ADN puede medirse hoy día a través de diferentes técnicas disponibles. Los cambios observados van desde la substitución de un simple nucleótido, que representa el tipo más común de mutación y que puede ser detectado a través del estudio y análisis de los polimorfismos de base única (SNP), hasta mutaciones que involucren mayores números de sitios nucleotídicos (Dodgson *et al.*, 1997).

Para efectuar estos estudios, ha sido de gran importancia el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) por Mullis *et al.* (1986), la cuál es una reacción enzimática catalizada por una ADN polimerasa, que permite la amplificación o reproducción «*in vitro*» de grandes cantidades de una región particular del ADN, a partir de una pequeña cantidad original de ADN molde. Esta enzima requiere, para la síntesis, de un par de oligos denominados iniciadores o «*primers*», cuyas secuencias son complementarias a la de las regiones flanqueantes 5' y 3' del segmento particular de ADN que se aspira amplificar.

Los marcadores de ADN, y en especial los microsatélites, están rápidamente reemplazando o complementando a otros marcadores o metodologías genéticas en las aplicaciones evolutivas y la conservación de las especies. Dado su elevado nivel de polimorfismo, resultan útiles para definir un único genotipo multilocus, de particular interés en estudios donde se requiera una escala muy fina de resolución y en los cuáles otros tipos de marcadores podrían presentar algunas limitaciones, siendo especialmente estos estudios los referidos a: análisis de paternidades, parentescos, asignación de individuos a raza,

planificación de apareamientos y otros aspectos de índole reproductiva (Jones *et al.*, 1986).

Un buen marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad, entre ellas, debe tener una buena distribución a lo largo del genoma y alto grado de polimorfismo. La técnica para analizar el marcador debe ser rápida, práctica y debe repetirse con fiabilidad en otros laboratorios (Cheng y Crittenden, 1994).

Variación genética y métodos de detección

Desde la aparición de la PCR se han desarrollado una serie de técnicas utilizadas para los estudios de variabilidad genética en las especies animales. Entre ellas técnicas se cita el uso de los marcadores genéticos (Cuadro 1), la cual se basa en la clonación y secuenciación de fragmentos de ADN, mientras que otros, más aleatorios, se basan en la detección de polimorfismos al azar (*fingerprint markers* o huellas digitales moleculares) (Dodgson *et al.*, 1997).

Algunas características y particularidades notables de los principales marcadores moleculares más utilizados en genética de poblaciones se detallan a continuación:

SNP (polimorfismo de base única)

Es un tipo de polimorfismo que corresponde a la diferencia en una simple posición nucleotídica, por ejemplo sustituciones, deleciones o inserciones de un solo nucleótido. La mayoría de este tipo de polimorfismo presenta sólo dos tipos de alelos (bialélica), y por ello son referidas algunas veces como marcadores bialélicos. Con la presencia solamente de dos alelos, la máxima heterocigosidad esperada para cada SNP es de solamente 50%, siendo por lo tanto menos informativo que las regiones satélites de

Cuadro 1. Principales tipos de marcadores de ADN y métodos de detección.

Tipo de Marcador	Acrónimo	Alias	Requiere:	Principal uso
Polimorfismo de base única	SNP's		ADN clonado, secuencias, etc.	Mapas de Ligamiento
Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción	RFLP		ADN clonado usualmente	Mapas de Ligamiento
Secuencias Repetidas Cortas	SSR	Microsatélites	AND clonado y secuencias	Mapas de Ligamiento
Secuencias de Sitios Marcados	STS		Secuencias de ADN	Mapas físicos
Secuencias Expresadas				
Marcadas	EST	Subset de STS	Secuencias de ADNc	Mapeos físicos y de ligamiento
Polimorfismo Amplificado Aleatoriamente	RAPD	DAF, AP-PCR	Oligos aleatorios	Fingerprinting
Secuencias de Numero y Tamaño Variable	VNTR	Minisatélites	Secuencias repetitivas y pruebas de hibridación	Fingerprinting
Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados	AFLP		Set de oligos diseñados y	Mapas de ligamiento específicos

Modificado de Dodgson *et al.*, 1997.

ADN (minisatélites y microsatélites), las cuales generalmente presentan múltiples alelos y sus valores de heterocigosis superan el 70%. En forma general, para la construcción de mapas genéticos a partir de SNP son requeridos hasta 3 veces más marcadores comparativamente que con los STRP's (Kwok *et al.*, 1996).

Aunque muchos de los SNP's se localizan en regiones no codificantes, un número importante de estas mutaciones que corresponden a sitios de genes (codificantes) se han asociado a enfermedades u otra expresión fenotípica. Su alta frecuencia en el genoma y su baja tasa de mutación, hacen que se constituyan como elementos deseables para la construcción de mapas genéticos. En el caso del genoma humano, donde mayoritariamente se han estudiado los SNP's, se estima que un SNP con una heterocigosis por encima del 30% se espera que se presente cada 1.3 kb (Kwok *et al.*, 1996).

Minisatélites o Número de Secuencias de Tamaño Variables (VNTR)

Marcadores polimórficos descubiertos por Jeffreys *et al.* (1985), en el que ciertas pruebas de hibridación para secuencias repetitivas generaban un complejo patrón de bandas que contenían un polimorfismo heredable. Los VNTR son repeticiones al azar en tándem de 10 a 60 pb, altamente polimórficos y con elevadas tasas de heterocigosis en las poblaciones (Vance y Othmane, 1998).

Microsatélites o Secuencias Repetidas Cortas (SSR)

Los microsatélites son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos (Figura 2). Algunas de las características de estos

marcadores *versus* otros (minisatélites, RFLPs, RAPDs, etc.) que son considerados por la mayoría de autores como una poderosa herramienta para estudios genéticos son: presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, tienen una confiabilidad del 100%, repetitivos y automatizables. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente (Goldstein y Schlotterer, 1999).

Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

Es una de las primeras técnicas descritas (Botstein *et al.*, 1980), desde la aparición de la PCR, y consiste en visualizar las diferencias al nivel de la estructura del ADN, basándose en el uso de enzimas de restricción que cortan el ADN en sitios donde se encuentran una secuencia específica de nucleótidos. La identificación de los fragmentos (RFLPs) requiere del uso de geles de electroforesis que permitan separar los fragmentos que difieren en tamaño. La limitación de esta técnica es que únicamente identifica dos alelos *por locus*, por lo que la variabilidad obtenida es reducida. Otra limitación es que la aproximación con RFLPs, para la búsqueda de polimorfismo en productos de PCR no es metodológicamente efectiva al 100%, ya que muchos SNPs potenciales podrían no cambiar un sitio de restricción, y por tanto no serían detectados por ella (Vance y Othmane, 1998).

Polimorfismo Amplificado Aleatoriamente (RAPD)

Representan a marcadores que se basan en el uso

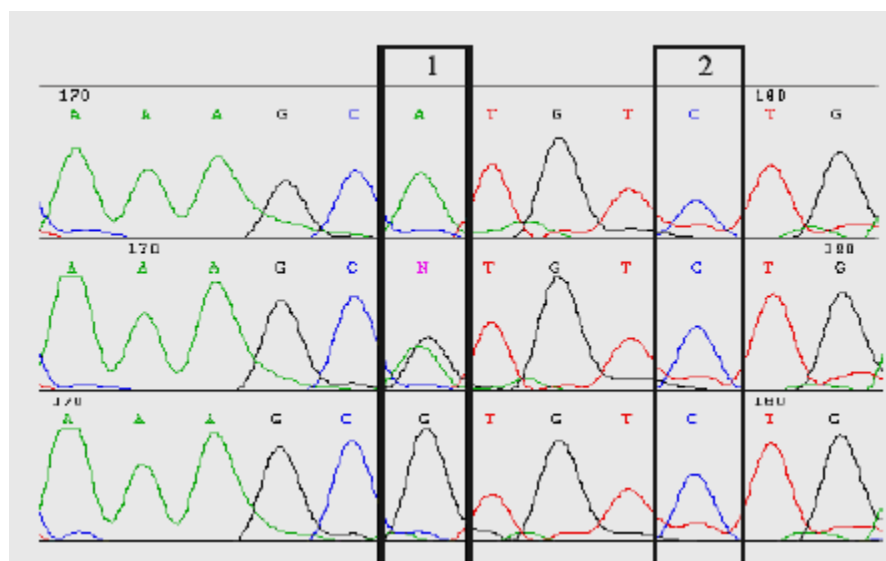


Figura 1. Descubrimiento de un SNP (1), obtenido mediante el alineamiento de fragmentos a partir de secuenciación directa de un producto de PCR. Fuente: Vignal *et al.*, (2002).



Figura 2. Microsatélites, ejemplo de un di-nucleótido A-C(n).

de oligonucleótidos (iniciadores) cortos, los cuáles a través de una reacción PCR, que se caracteriza por temperaturas de «*annealing*» bajas, lo cual genera una serie de fragmentos de amplio espectro a partir del ADN molde. La habilidad consiste entonces en encontrar aquellos fragmentos amplificados y que resulten ser polimórficos, los cuáles pueden posteriormente ser mapeados. Una de las principales limitaciones del uso de los RAPDs es la baja repetibilidad de los análisis, aunado a la necesidad de usar un gran panel de RAPDs, lo que representa un elevado valor económico y un laborioso trabajo analítico. Asimismo, y dado que es un marcador genético de tipo dominante, no podemos discriminar la existencia de heterocigotos, subestimando la cantidad de polimorfismo existente (Levin *et al.*, 1994).

Marcadores microsatélites

Dado que los microsatélites están más o menos distribuidos a lo largo de todo el genoma de los eucariotas, aunque con baja frecuencia en las regiones codificantes y, quizás también en los telómeros, su presencia en estas regiones se ha descrito asociada a enfermedades (Armour *et al.*, 1994; Hancock, 1999; Tautz y Schlotterer, 1994). Sin embargo, aún se desconoce el significado funcional de estas secuencias, a pesar de que la hipótesis más aceptada apunta a que pueden estar relacionados con el empaquetamiento y la condensación del ADN en los cromosomas (Vanhala *et al.*, 1998).

Debido a particulares ventajas, el uso de microsatélites ha tenido un gran impacto en el estudio de la genética de animales y plantas. Desde su descubrimiento en 1989 (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989). El análisis con microsatélites involucra la detección de fragmentos específicos de ADN y nos da la medida de los alelos (en pares de bases, pb) en cada una de las regiones.

Aplicaciones de los microsatélites

Identificación Individual y Pruebas de Paternidades:

El principio de las pruebas de paternidad utilizando marcadores genéticos consiste en la comparación del genotipo y/o fenotipo de la descendencia

con el de sus progenitores. Como principio «mendeliano», uno de los alelos que presenta un individuo proviene del padre y el otro de la madre. En dicho análisis, al igual que la identificación individual, la identificación del (os) testigo (s), tanto a nivel fenotípico como genotípico debe ser perfectamente conocida y concordante con la información obtenida en los análisis realizados al individuo.

El elevado polimorfismo que presentan estos marcadores y la posibilidad de poder detectar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, ya que resulta muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de marcadores, compartan todos sus alelos. Para seleccionar los marcadores a utilizar, estos deberían reunir las características descritas anteriormente y presentar además: alta variabilidad, herencia estable (baja tasa de mutación), elevada reproductividad y precisión, la no presencia de alelos «nulos», ser un procedimiento fácil, rápido, económico, potencialmente automatizable, que la información del genotipo pueda ser transferida rápidamente, que la fuente de ADN no esté limitada únicamente a muestras sanguíneas frescas ni a grandes cantidades de ADN y por último, presente una segregación independiente con otros marcadores al ser combinados en la prueba.

Durante las últimas décadas las pruebas de paternidad en équidos (específicamente en caballos) se han venido realizando principalmente a través de la tipificación sanguínea, incluyendo tanto pruebas serológicas como grupos sanguíneos (hemotipados); así como, análisis electroforéticos del polimorfismo de proteínas y enzimas sanguíneas (alozimas). Siete sistemas de grupos sanguíneos y 16 polimorfismos bioquímicos han sido reconocidos internacionalmente y utilizados rutinariamente a nivel mundial, como herramientas oficiales para la prueba de paternidad (ISAG, International Society of Animal Genetics). La combinación de estos sistemas proporciona un 97% de probabilidad de detectar o asignar un padre o una madre incorrecta y cerca del 100% de probabilidad para un cruzamiento entre individuos

de otras razas (Bowling y Clark, 1985, Bowling, 2001). Actualmente, con un conjunto aproximado de 10-12 marcadores microsatélites, se obtiene una efectividad teórica para detectar parentescos incorrectos (PE) por el orden del 99.99% (Aranguren-Méndez *et al.*, 2001; Bowling *et al.*, 1997).

Mapas Genéticos y Genómica Comparativa:

Otra aplicación, de los microsatélites es la construcción de mapas de ligamiento más completos y detallados; así como la identificación de genes de interés (QTL's).

Todos los marcadores pueden ser utilizados para mapas de ligamiento; sin embargo, se requiere, que los alelos se segreguen independientemente y que además puedan ser monitoreados a través del pedigrí. La descendencia puede ser informativa si los progenitores son doble heterocigotos en los *loci* analizados. Los *loci* situados en cromosomas distintos podrían recombinarse libremente durante la gametogénesis parental hasta un 50% (segregación independiente); mientras que, si se encuentran en el mismo cromosoma recombinarían con una frecuencia que oscila entre 0 a 50% dependiendo de la distancia en centi-morgans (cM) presente entre ellos.

Así, un mapa genético bien surtido de marcadores se convierte en una herramienta muy útil para identificar genes responsables de caracteres de interés. Se trata de buscar asociación entre varios alelos, en cualquiera de los marcadores, segregando en poblaciones que presentan el carácter de interés, para identificar regiones del genoma donde es más probable que se encuentre el gen responsable de ese carácter (Cheng *et al.*, 1995).

Actualmente existen proyectos internacionales para elaborar mapas genéticos en las principales especies domésticas (Roslin Institute, <http://www.ri.bbsrc.ac.uk>), los cuales describen abundantes marcadores de este tipo.

Estudios de Genética Poblacional:

Representa una de las áreas en donde los microsatélites han sido más ampliamente utilizados, ya que nos permite estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudio es de gran importancia para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la consanguinidad existente en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción.

Durante los últimos años se han realizado muchos estudios que han utilizado los microsatélites para análisis filogenéticos, concluyendo que, con un buen número de *loci* analizados y con apropiadas tasas de mutación, los microsatélites pueden dar una buena aproximación de la filogenia (Aranguren-Méndez *et al.*, 2001, 2002(a), 2002(b), 2002(c), 2002(d); Farid *et al.*, 2000; Ishida *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 1994;

Loftus *et al.*, 1994; Peelman *et al.*, 1998; Saitbekova *et al.*, 1998; Takezaki y Nei, 1996).

En los estudios de genética de poblaciones, los marcadores permiten la identificación de cada alelo por *locus*, la obtención de datos poblacionales, y el cálculo de las frecuencias alélicas. De esta manera podemos estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos (Bowcock *et al.*, 1995, Ponsuksili *et al.*, 1999); así como también realizar análisis filogenéticos y de estructura de la población. La diversidad o variabilidad genética se puede definir como «la capacidad genética para variar», y por ende, la capacidad a responder tanto a variaciones de índole ambiental como a cambios en los objetivos de selección. Es así, como la variabilidad genética constituye la base del progreso genético (Rochambeau *et al.*, 2000).

Asignación de Individuos a Raza:

Diferentes procedimientos han sido informados para este propósito, indicando una gran variedad de aplicaciones y de metodologías para la correcta identificación de la fuente poblacional (Cornuet *et al.*, 1999, Paetkau *et al.*, 1995, Rannala y Mountain, 1997).

Los dos métodos más utilizados para asignar individuos a poblaciones o razas son: basados en probabilidades y basados en distancias genéticas. En los primeros, los individuos son asignados a aquella población en la que su genotipo presenta una mayor probabilidad de pertenencia; mientras que, en los segundos, los individuos son asignados a la población que genéticamente sea más cercana.

Métodos Basados en Probabilidades:

a.- Método de frecuencias:

Este método fue descrito originalmente por Paetkau *et al.* (1995), y consiste en asignar un individuo a una población basándose en el valor de probabilidad de su genotipo individual de pertenecer a ella. La asignación por este método se realiza en tres etapas: a.1.- Calcula las frecuencias alélicas de todas las poblaciones potenciales. a.2.- Calcula la probabilidad de ocurrencia de cada genotipo multilocus para cada una de las poblaciones y a.3.- Asigna el individuo a aquella población en la cuál el genotipo multilocus obtuvo la mayor probabilidad.

b.- Método Bayesiano:

Este método es bastante similar al anterior y está muy relacionado con lo reportado por Rannala y Mountain (1997), quienes utilizaron la metodología Bayesiana para detectar migrantes mediante el uso del genotipado multilocus. Asumiendo una función de densidad igual a *priori* de las frecuencias alélicas de cada *locus* en cada población, Rannala y Mountain (1997), mostraron que la probabilidad marginal de observar un individuo con un genotipo $A_k A_k$ en el *locus j* y en la población *i* es igual a:

$$((n_{ijk} + 1 / K_j + 1) (n_{ijk} + 1 / K_j)) / ((n_{ij} + 2) (n_{ij} + 1)) \text{ si } k = k'$$

ó

$(2(n_{ijk} + 1 / K_j)(n_{ijk} + 1 / K_j)) / ((n_{ij} + 2)(n_{ij} + 1))$ si $k^1 k'$
 donde n_{ijk} es el número de alelos k muestreados en el locus j y en la población i (que no contiene al individuo a ser asignado), n_{ij} es el número de copias de genes muestreados en el locus j y en la población i y K_j es el número total de alelos observados del locus j en las poblaciones estudiadas.

Métodos Basados en Distancias:

Los métodos basados en distancias asignan el individuo a la población genéticamente más cercana o próxima. Para ello se requiere definir una distancia entre el individuo y la población. Se han definido numerosas distancias genéticas; sin embargo las podemos agrupar en dos grandes bloques: las distancias entre poblaciones (p.e. distancias de Nei; distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards, etc.) y las distancias entre individuos (eje. distancia de alelos compartidos (D_{AS})) (Chakraborty y Jin, 1993).

En el primer caso se adaptan estas distancias a la relación entre individuo-población, considerando a los individuos cómo una muestra de dos genes (los posibles valores de frecuencias alélicas son 0, 0,5 y 1). Mientras que, en el caso de los alelos compartidos (D_{AS}), la distancia entre un individuo y la población se toma como el promedio de distancia entre el individuo y los miembros de esa población (Aranguren-Méndez *et al.*, 2002(b)).

A pesar de las grandes ventajas que poseen los microsatélites como marcadores moleculares, existen también otros factores a considerar que pueden disminuir el poder y/o la sensibilidad de éstos como marcadores de elección, o pueden ser fuente de error que disminuya su utilidad en los estudios genéticos. Estos factores son: el patrón de mutación, los alelos nulos y la homoplasia.

Mutación, alelos nulos y homoplasia en los microsatélites

Mutación:

Las mutaciones son alteraciones del material genético y en ellas se incluyen desde simples sustituciones de un solo nucleótido hasta las deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos. La mayoría de las mutaciones en animales no conllevan a cambios en el fenotipo, ya que, ocurren en regiones no-codificantes (mutaciones silentes). De forma general, las regiones o secuencias codificantes muestran una baja tasa de mutación que se ve reflejada en la escasa variabilidad existente dentro de especies y el alto grado de conservación que presentan estas regiones entre especies (Eisen, 1999). El elevado grado de conservación de estas regiones se pueden explicar muchas veces por el hecho de que las mutaciones dentro de esta región son deletéreas, ya que causan la pérdida de una función importante y por lo tanto son eliminadas por selección purificadora.

Entender el proceso mutacional de los microsatélites es esencial antes de inferir las relaciones existentes entre la variación observada y las distancias genéticas o la estructura de una población. Los microsatélites, a diferencia de otros marcadores, tales como proteínas o enzimas, presentan un patrón diferente de mutación, ya que en primer lugar, la mayoría de las mutaciones están involucradas por la ganancia o pérdida de una simple unidad de repetición (Weber y Wong, 1993), además de la propia presencia de homoplasia, la cuál a su vez causa una subestimación de la cantidad total de variación entre poblaciones y por ende de las distancias genéticas; por lo tanto, ocurre una sobreestimación de las similitudes entre las poblaciones.

La tasa de mutación en los microsatélites ha sido estimada en un rango que oscila entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones por gameto (Bowcock *et al.*, 1995, Forbes *et al.*, 1995); sin embargo, el mecanismo cómo los microsatélites mutan es aún desconocido. Dos mecanismos son los que principalmente han sido propuestos: en primer lugar se cita un desigual cruce en la meiosis y en segundo lugar un desliz de la hebra del ADN durante la replicación, siendo al parecer esta última, la principal causa de mutación de los microsatélites (Goldstein y Schlotterer, 1999).

In vitro, algunos factores intrínsecos, tales como, la longitud de la repetición y la composición (tipo de base nitrogenada) han demostrado que pueden afectar la tasa de mutación de los microsatélites. Es así como los dinucleótidos presentan tasas de mutación más elevadas que los trinucleótidos, y las secuencias con alto grado de AT (adenina-timina) en su composición mutan a mayores tasas que las que presentan altas combinaciones de GC (guanina-citosina) (Schlotterer y Tautz, 1992).

Los dos principales modelos que se han utilizado para modelar el proceso mutacional de los microsatélites son: el modelo de alelos infinitos (IAM) y el modelo mutacional por pasos (SMM). En el IAM se supone que la mayoría de nuevas mutaciones dan lugar a nuevos alelos distinguibles, es decir, los nuevos alelos mutantes son siempre diferentes a los que ya existían en la población original, por lo que en este caso la homoplasia no existe o es despreciable. En el SMM los alelos sólo pueden mutar por la ganancia o pérdida de una sola unidad de repetición; debido a esto, queda claro que puede existir una gran cantidad de homoplasia. Ambos modelos son por lo tanto extremos. Otro modelo intermedio que se cita en la literatura, aunque con menor frecuencia es el de dos fases (TPM) y es igual al SMM, pero permite que se puedan dar mutaciones de mayor magnitud (Teoría de la Coalescencia) y predice la varianza esperada en número de repeticiones de un microsatélite, bajo distintos procesos mutacionales e historias de-

mográficas. En este modelo se pueden dar «mutaciones viejas» (alelos ya existentes en la población), pero también «mutaciones nuevas» (alelos nuevos en la población), con lo cuál la cantidad de homoplasia existente siempre será menor que en el modelo SMM. Por lo tanto TPM en la práctica sería más parecido al IAM (Di Rienzo *et al.*, 1994; Murray, 1996).

Al principio se esperó que los microsatélites siguieran el SMM, pero los análisis experimentales han demostrado que no se trataba de un modelo simple (Kwok *et al.*, 1996). Parece ser que, dependiendo del tamaño de la unidad de repetición, un microsatélite se adapta más a un modelo o al otro. Los microsatélites de repeticiones de 3-5 pb parece que sí siguen el SMM (Tautz y Schlotterer, 1994), mientras que los de 1-2 pb siguen el IAM o el TPM (Vanhala *et al.*, 1998), al igual que los minisatélites (repeticiones de 10-60 pb) (Estoup *et al.*, 1999).

Alelos Nulos:

Se habla de alelos nulos cuando estos no pueden ser amplificados por PCR, debido principalmente a una mutación en el punto de hibridación del iniciador. Uno de los alelos no amplifica y por lo tanto el individuo es catalogado como homocigoto para el otro alelo (Dawson *et al.*, 1997). La existencia de alelos nulos es especialmente difícil de detectar cuando su frecuencia en la población es baja y cuando no se dispone de información genealógica fiable. Su determinación sería posible si se presentara en homocigosis, ya que no obtendríamos producto amplificado de un determinado individuo para ese *locus*.

En los casos de verificación de paternidades, podemos sospechar la presencia de alelos nulos en un marcador cuando todos los demás marcadores apuntan a un progenitor y sin embargo, es homocigoto para ese marcador excluyente, siendo el descendiente homocigoto para ese marcador para uno de los alelos parentales. Un alelo nulo podría llevarnos a interpretaciones erróneas y excluir a estos animales como posibles progenitores en un análisis de paternidad, además de sesgar las estimaciones de las frecuencias alélicas en las poblaciones. Otra manera para detectar la presencia de alelos nulos sería a partir del cálculo del déficit de heterocigotos para el equilibrio Hardy-Weinberg (Neuman y Wetton, 1996).

Para solucionar el problema de los alelos nulos se pueden diseñar cebadores alternativos fuera del punto de mutación y volver a analizar los individuos clasificados como homocigotos. Asimismo, esto se puede evitar no utilizando marcadores que han sido reportados como portadores de alelos nulos en ciertas poblaciones o razas, ya que pueden darnos problemas de esta índole (Dawson *et al.*, 1997, Mundy y Woodruff, 1996).

Homoplasia:

Originalmente, el término «homoplasia» fue utili-

zado por los evolucionistas para referirse al hecho de que un mismo carácter, presente en dos especies, no siempre ha derivado del mismo carácter ancestral. A nivel genético, se dice que dos alelos son homoplásicos cuando poseen un estado idéntico, aunque no sea por descendencia (Estoup y Cornuet, 1999).

La homoplasia se refiere al hecho de que dos alelos tengan el mismo tamaño (pb) pero no es debida a que sean idénticos. Se toma como idénticos por tener el mismo tamaño pero intrínsecamente existen claras diferencias en cuanto a su estructura, presencia de inserciones y/o deleciones, cambios de bases o variaciones en la región flanqueante (Primmer y Ellergren, 1998).

Éste es un tipo de polimorfismo que puede detectarse únicamente por secuenciación, y puede pasar inadvertido en caso de analizar individuos mediante amplificación por PCR y electroforesis para asignar tamaños. La homoplasia en las pruebas de paternidad y parentesco nos supone una relación cuando no la hay o viceversa. También puede ser fuente de error en estudios poblacionales o de evolución porque la tasa de mutación de los microsatélites está relacionada de forma compleja con el tamaño y composición del alelo. Por ejemplo, los alelos interrumpidos o compuestos conllevan con más frecuencia a casos de homoplasia (Tautz y Schlotterer, 1994).

En modelos mutacionales del tipo IAM se supone la no presencia de homoplasia, ya que una nueva mutación produce la creación de un nuevo alelo; en este caso totalmente distinto al que existía previamente en la población. Sin embargo, los otros modelos de mutación (SMM, TPM) pueden llegar a generar homoplasia y la cantidad dependerá de la tasa de mutación presente en la población.

En los marcadores del tipo microsatélite se espera en teoría una cierta cantidad de homoplasia, ya que existe evidencia de que directa o indirectamente los microsatélites presentan un tipo de mutación del tipo SMM o TPM; los microsatélites se caracterizan por presentar una elevada tasa de mutación que puede oscilar entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones por *locus* y generación (Renwick *et al.*, 2001); por último, el rango limitado de tamaños de alelos presentes en los microsatélites reduce los posibles estados alélicos favoreciendo la cantidad de homoplasia (Nauta y Weissing, 1996; Estoup *et al.*, 1999).

Análisis de la variabilidad genética

Existe una gran diversidad de estadísticas para cuantificar la variabilidad genética y resumir la información a términos más manejables. Los estadísticos más empleados son: porcentaje de *loci* polimórficos, el número medio de alelos por *locus*, la heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) y el índice de contenido de polimórfico (PIC) (Aranguren-

Méndez *et al.*, 2001, 2002(b).

Porcentaje de *loci* polimórficos:

Un *locus* se considera polimórfico si podemos detectar más de un alelo en una población. Generalmente el criterio más utilizado es el del 1%, es decir, un *locus* será polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 99% en la población bajo estudio.

Número medio de alelos por *locus*:

Esta estadística indica el número medio de alelos que presenta un *locus* en una población. Sin embargo, dicha medida depende mucho del número de individuos analizados, ya que cuando el número es grande, mayor es la probabilidad de detectar alelos suplementarios. No obstante, este estadístico es útil para estudiar la existencia de variabilidad críptica en los *loci*.

Heterocigosidad (H):

Representa una mejor medida de la variación genética, ya que es precisa y no arbitraria. La heterocigosidad la podemos estudiar como H_O y H_E .

La H_O se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los *loci* y se calcula por cómputo directo. Mientras que la H_E , desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Crow y Kimura, 1970). En una población en equilibrio H-W, la frecuencia de los heterocigotos viene dada por la ecuación $2pq$.

El cálculo de la H_E en la población puede realizarse a través de: $H_E = 1 - \sum p_i^2$

siendo p_i^2 = (homocigosidad) o también su equivalente: $H_E = \sum p_i(1 - p_i)$ siendo este término también conocido como diversidad génica de Nei (1977).

Según Zapata (1987), la H_E es un buen estimador de la variabilidad, dado que se aplica a cualquier especie, independientemente de su estructura reproductiva o genética, pudiéndose por tanto realizar comparaciones entre ellas.

Índice de Contenido Polimórfico (PIC):

El PIC es similar al valor de heterocigosidad y oscila entre 0 y 1. Este índice evalúa la informatividad de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. Para su cálculo se multiplica la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado a partir de las frecuencias alélicas) por la probabilidad que sean informativos, es decir, que se pueda identificar al progenitor del que procede el alelo (Botstein *et al.*, 1980).

$n-1$

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

$i=1$ $i=1$ $j=i-1$

Donde $p_1 \dots p_n$ son las frecuencias de los n alelos.

Probabilidad de exclusión (PE):

Expresa la probabilidad de que la asignación errónea de un progenitor sea detectada por el análisis (Jamieson, 1994).

$$PE = \left\langle p_i - 2 \sum p_i^2 + 2 \sum p_i^3 + 2 \sum p_i^4 - 3 \sum p_i^5 - 2 \left(\sum p_i^2 \right)^2 + 3 \sum p_i^2 p_i^3 \right\rangle$$

$$PE = \left\langle p_i (1-p_i)^2 - \left\langle (p_i p_j)^2 (4 - 3(p_i + p_j)) \right\rangle \right\rangle$$

donde $i > j$ $p_1 \dots p_n$ son las frecuencias de los alelos.

$PE_{tot} = 1 - ((1-PE_1)(1-PE_2) \dots (1-PE_n))$; a la probabilidad global de un conjunto de marcadores.

Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W):

La ley de Hardy-Weinberg (Hardy, 1908; Weinberg, 1908) representa a una población grande de individuos diploides, con reproducción sexual aleatoria, sin selección, mutación y migración, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación y, además, existe una relación simple entre ambas. Así, una población con frecuencias génicas y genotípicas constantes, se dice que está en equilibrio H-W.

Cuando la población se desvía de manera significativa de estas proporciones se habla de desequilibrio H-W, y se puede medir mediante el índice de fijación F (Wright, 1965), el cual se expresa para un *locus* cualquiera como:

$$F = (H_E - H_O) / (H_E)$$

Siendo H_E y H_O la heterocigosidad esperada y observada para ese *locus*, respectivamente. Cuando el índice de fijación F es igual a cero se indica que la población está en equilibrio; mientras que si F es diferente de cero, ya sea en forma positiva o negativa, indicaría que existe un déficit o exceso de heterocigotos, respectivamente.

Análisis de la estructura poblacional

Antes de realizar los análisis de la estructura poblacional es esencial probar la variación genética encontrada mediante los microsatélites, con el objeto de que no se haya violado alguna de los supuestos básicos en un análisis poblacional. Estos supuestos son tres: a) selectiva neutralidad de cada *locus*, b) la inexistencia de alelos nulos y c) independencia de los *loci* (Murray, 1996).

Efectos como la selección, puede confundir los resultados, y cualquier *loci* que esté presumiblemente ligado a un carácter de interés selectivo debe ser descartado del análisis. Aunque la mayoría de los microsatélites se comportan de manera neutral (Murray, 1996).

Para los estudios de la estructura de la población los análisis de la F -estadística han mostrado ser una herramienta útil para dilucidar los patrones y extraer la variación genética residente entre y dentro de las poblaciones. Según estos estadísticos, la variabilidad de una población global puede ser subdividida entre

sus subpoblaciones (Aranguren-Méndez *et al.*, 2002(d).

Wright (1965) definió tres *F*-estadísticas: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} , como correlaciones entre unidades gaméticas en la población a diferentes niveles. Los estadísticos F_{IS} y F_{IT} explican las correlaciones entre dos unidades gaméticas tomadas al azar de una subpoblación y del total de la población como un todo respectivamente; y nos indica el exceso o déficit de heterocigotos presentes; mientras que el F_{ST} es la correlación entre dos gametos tomados al azar de cada una de las subpoblaciones y mide el grado de diferenciación genética entre dos subpoblaciones. Estos parámetros se relacionan a través de la siguiente expresión:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS}) \cdot (1 - F_{ST}) \quad (1)$$

Pudiéndose inclusive en algunos casos extender el análisis a niveles jerárquicos adicionales dentro de la población, y en casos de análisis de variabilidad genética intraracial, subdividiendo las razas en subpoblaciones, hasta dos niveles jerárquicos, por lo que la ecuación (1) extendida sería:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS}) \cdot (1 - F_{SC}) \cdot (1 - F_{CT})$$

donde F_{SC} y F_{CT} miden el grado de diferenciación genética entre subpoblaciones dentro de razas y dentro de las subpoblaciones, respectivamente (5).

La desviación del equilibrio H-W puede ser debida a una variedad de causas. Si los resultados arrojan un exceso de heterocigotos, podría en este caso ser atribuida a la presencia de una selección sobredominante o la ocurrencia de migraciones en la población estudiada; si por el contrario los hallazgos son de déficit de heterocigotos, podría deberse a cuatro factores principalmente; en primer lugar, que el *locus* esté bajo selección; en segundo lugar, a la presencia de alelos nulos en esa población, dando una falsa lectura de un exceso de homocigotos; en tercer lugar a altos niveles de consanguinidad en la población, producto de apareamiento entre individuos emparentados y, en cuarto lugar, se atribuiría a la presencia de una cierta subestructuración reproductiva de la población (efecto «Wahlund») (Nei, 1987).

Nei (1977), reformuló los índices *F*, basándose en los valores de H_O y H_E . En este modelo, el cuál es independiente del número de alelos presentes en cada *locus*, la diferenciación o estructura de la población se mide por un parámetro denominado G_{ST} (Nei, 1973, 1977), análogo al F_{ST} y que cumple la siguiente relación:

$$(1 - G_{IT}) = (1 - G_{IS}) (1 - G_{ST});$$

donde:

$$G_{ST} = (H_T - H_S) / (H_T)$$

H_S es equivalente a la anterior H_E , mientras que H_T se define como la heterocigosidad media esperada por *locus* en la población total: $H_T = (\sum_k h_k) / k$; siendo k el número de *loci* y h_k la heterocigosidad esperada en la población total para un determinado *locus*. Una vez introducida la definición de diversidad genética de Nei (G_{ST}), H_S viene a representar la diversidad genética dentro de la subpoblación y H_T la diversidad genética en la población total.

Análisis de la diferenciación genética

Para estudiar las diferencias entre poblaciones se han de comparar las frecuencias alélicas observadas de cada *locus* mediante una prueba adecuada y calcular las distancias genéticas entre ellas. En este sentido, la distancia genética mide el grado de diferenciación existente entre poblaciones de una misma especie, o entre especies, pudiéndose cuantificar esa diferencia mediante diferentes índices de distancias.

Las distancias genéticas ayudan a entender las relaciones evolutivas entre poblaciones y nos permite obtener información para caracterización de razas (Nagamine y Higuchi, 2001). De las distancias genéticas es importante estudiar el tipo de distancia, el método de construcción del dendrograma o algoritmos y el análisis de remuestreos.

Distancias Genéticas:

Las distancias genéticas son estimadoras del tiempo de separación entre poblaciones y se basan en ciertas diferencias genéticas existentes dentro y entre poblaciones. Algunas de las distancias genéticas están enfocadas en los cambios de las frecuencias génicas (p.e. F_{ST}); mientras que otras incorporan además el proceso mutacional, y en el caso específico de los microsatélites éstas se denominan distancias por paso o etapas (stepwise). Las matrices de las distancias genéticas entre poblaciones pueden ser convertidas en árboles evolutivos utilizando métodos de agrupamiento, tales como, el método de agrupamiento no ponderado por pares utilizando la media aritmética (UPGMA) o el Neighbour Joining (NJ) (Goldstein y Schlotterer, 1999).

Suponiendo diferentes modelos mutacionales para los *loci* que codifican para proteínas (IAM) y para los *loci* microsatélites (SMM), Takezaki y Nei (1996) estudiaron la eficacia mediante simulación por ordenador de diferentes medidas de distancia en la correcta reconstrucción de una filogenia conocida. Dichas distancias correspondieron a:

a.- *Distancia estándar de Nei* (D_S (Nei, 1972)):

$$D_S = -\ln (J_{xy} / \bar{J}_x \bar{J}_y)$$

donde J_x y J_y son las homocigosis medias sobre *loci* en la población X e Y, respectivamente.

Bajo el proceso mutacional IAM se espera que la D_S incremente linealmente con el tiempo, si se mantiene un balance entre deriva y mutación a través de

todo el proceso evolutivo.

b.- Distancia mínima de Nei (D_m (Nei, 1973)):

$$D_m = (J_x + J_y) / (2 - J_{xy})$$

En este caso la esperanza de D_m es conocida como: $E(D_m) = J(1 - e^{-2vt})$, donde J es la homocigosis de las dos poblaciones.

*c.- Distancia de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983):*

$$DL = -\ln(1 - F_{ST}); F_{ST} @ q_{ST} = ((J_x + J_y) / (2 - J_{xy})) / (1 - J_{xy})$$

d.- Distancia de Rogers (Rogers, 1972):

$$D_R = (1/r) \sum_{i,j} (x_{ij} - y_{ij})^2 / 2$$

*e.- Distancia de Prevosti (Cp; (Prevosti *et al.*, 1975)):*

Esta distancia posee las mismas propiedades estadísticas que la D_R y se define como:

$$Cp = \sum_{i,j} (x_{ij} - y_{ij})^2 / (2r)$$

f.- Distancia de cuerda (D_C ; (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967)):

$$D_C = (2/r) \sum_{i,j} (x_{ij} - y_{ij})^2$$

La D_C representa las poblaciones como puntos en la superficie de una hiperesfera multidimensional usando las frecuencias alélicas. La distancia entre ellas sería dada a partir de la longitud cordal entre los puntos.

*g.- Distancia «A» de Nei (D_A ; (Nei *et al.*, 1983)):*

$$D_A = (1/r) \sum_{i,j} (1 - x_{ij} y_{ij})$$

Nei simuló esta distancia (D_A) con el proceso mutacional IAM y demostró que era más eficiente que la D_S , D_m , D_R y D_C en la asignación de correctas topologías.

Otra distancia es la dm^2 de Goldstein *et al.* (1995), la cuál es la más reciente y como producto de la aparición de los primeros estudios con ADN microsatélite. Dado que estos marcadores poseen un elevado grado de polimorfismo con respecto al número de repeticiones, su número puede aumentar o

disminuir por un proceso mutacional del tipo SMM. Bajo este modelo de mutación, un alelo i (alelos con i repeticiones) se supone que puede mutar a otro alelo en un estado $i + 1$ ó $i - 1$ con igual probabilidad, aludiendo un mejor análisis para este tipo de marcador y denotándose de la siguiente manera:

$$(dm)^2 = \sum_j (mx_j - my_j)^2 / r$$

donde $mx_j = (\sum_i i x_{ij})$ y $my_j = (\sum_i i y_{ij})$ representan los estados alélicos medios del j -ésimo locus y x_{ij} e y_{ij} son las frecuencias de los alelos en el estado i en el j -ésimo locus en la población X e Y, respectivamente.

En estos estudios Takezaki y Nei (1996) concluyen con respecto a las distancias genéticas generadas a partir de datos de estudios con marcadores clásicos, los cuáles presentan un modelo de mutación IAM, y con microsatélites con mutación del tipo SMM. Las distancias más eficientes para ambos modelos resultaron ser D_C y D_A para la correcta asignación de topologías, y la distancia estándar (D_S) y dm^2 resultaron ser las más apropiadas para estimar los tiempos evolutivos, coincidiendo con otros reportes (Aranguren-Méndez *et al.*, 2002(b), Nagamine y Higuchi, 2001, Ruane, 1999).

Matemáticamente, cualquiera de estas funciones debe poseer ciertas propiedades para poder ser consideradas como una distancia. Primero, la distancia entre una población A y ella misma debe ser cero (0), de aquí que $d_{(A,A)} = 0$. Segundo, la distancia entre la población A y la población B debe ser simétrica, o lo que es lo mismo $d_{(A,B)} = d_{(B,A)}$; si una distancia satisface estas propiedades se denomina distancia semi-métrica y si además logra satisfacer la desigualdad triangular $d_{(A,B)} \leq (d_{(A,C)} + d_{(B,C)})$ se denomina distancia métrica (Eding y Laval, 1999); la distancia D_S de Nei, no cumple estas propiedades, ya que no es una distancia métrica.

Métodos de Agrupamiento o Algoritmos:

En la construcción de los árboles filogenéticos existen diferentes métodos para dibujar la matriz de distancias. Sin embargo, los más empleados son el NJ y el UPGMA, los cuáles generalmente dan muy buenos resultados. A pesar de ello el primero parece ser superior cuando se suponen en el modelo diferentes tasas de evolución (Eding y Laval, 1999, Takezaki y Nei, 1996).

El método NJ fue descrito por Saitou y Nei (1987), se caracteriza por que construye árboles mediante sucesivos agrupamientos de alineaciones, tomando en cuenta las longitudes de rama para dichos agrupamientos. Una vez realizado el agrupamiento deriva la mejor aproximación para la máxima parsimonia, construyendo los grupos apareados sobre la base de la mínima longitud de rama. Las dos princi-

pales características de este método son que los resultados nos dan un árbol no rotado (sin raíz u origen evolutivo), y luego este no supone un reloj evolutivo.

Por otra parte, el método UPGMA construye los árboles o dendrogramas mediante sucesivos agrupamientos bajo el criterio del promedio de la distancia de cada par. Se caracteriza porque supone una tasa constante de cambios evolutivos, es decir, supone la existencia de un reloj evolutivo y los árboles son rotados. Weir (1996) lo definió como una distancia entre grupos, producto del promedio de todas las distancias entre pares de cada una de las combinaciones.

Es así como los dendrogramas no son más que la representación gráfica de una matriz de distancias, y que bajo ciertas condiciones, esta representación puede ser tomada como una estimación de la filogenia

Análisis de Remuestros:

Dado que la estimación de las distancias genéticas entre poblaciones es un método estadístico, el proceso de muestreo es sumamente importante. Existen varias técnicas estadísticas para remuestros de los datos de *loci* genéticos. Entre ellas se encuentran el «Bootstrapping» y el Jackknife. Estas técnicas permiten la posibilidad de dibujar múltiples árboles y estimar la fiabilidad para los diferentes nodos en el árbol, así como el nivel de confianza del árbol (Weir, 1990).

El «bootstrapping» es una técnica que genera información adicional acerca de la distribución de los parámetros. Dado que los datos consisten en n observaciones, un «bootstrap» genera una muestra de n dibujos al azar, realizado por medio del reemplazamiento de los datos originales. De este modo, todas las observaciones originales tienen la misma oportunidad de ser reemplazados, y al final el valor de los nuevos «bootstrap» será el promedio para el parámetro muestreado (Tivang, 1994; Weir, 1990). Generalmente este proceso se repite un gran número de veces (≈ 1000), creando un gran número de «nuevos» conjuntos de datos, pudiéndose usar además para estimar medias y desviaciones estándares de un estimador calculado con los datos en cuestión.

La técnica del Jackknife, por otro lado, es un simple re-muestreo numérico, que consiste en generar un «nuevo» valor estimado a partir de la técnica iterativa basada en la estimación de máxima verosimilitud después de excluir la i -ésima observación. Así, cada nuevo valor estimado estaría basado en $n-1$ observaciones. La principal limitación de esta técnica es la poca información que proporciona acerca de la distribución de los estimadores (Weir, 1996).

Diversidad de Weitzman:

El análisis de Weitzman es otro método para la construcción de árboles filogenéticos basado en la función de diversidad (Weitzman, 1992, 1993). Dado

que en los programas de conservación genética el principal objetivo es preservar la variabilidad dentro de la población, bajo la hipótesis de existencia de correlación entre la variación genética y la viabilidad de la población, se hace necesario cuantificar la biodiversidad para así racionalizar mejor la política de conservación (Weitzman, 1992).

La diversidad de Weitzman se define como la diversidad esperada después de un cierto periodo de tiempo, y se basa en la probabilidad de extinción de cada elemento (población o raza) en un conjunto o grupo considerado. Si n elementos están en peligro de extinción, ambos patrones (supervivencia y/o extinción) pueden ocurrir con una cierta probabilidad. Para cada uno de ellos pueden calcularse los correspondientes valores de diversidad (Thaon D'arnoldi *et al.*, 1998). Una vez conocida la consanguinidad de una población o raza, ésta puede utilizarse como su propia probabilidad de extinción, proporcionando un orden prioritario sobre las razas a conservar (Aranguren-Méndez *et al.*, 2002(c)).

Conclusiones

Los análisis con marcadores genéticos del tipo microsatélite para el estudio de poblaciones resultan muy útiles y valiosos, ya que además de la evaluación de la variabilidad genética, la información generada permite estudiar con mayor exactitud la estructura genética y la caracterización molecular de las poblaciones y/o razas. Así mismo, esta revisión confirma que los microsatélites pueden ser usados eficazmente para establecer las relaciones genéticas entre poblaciones y razas, de gran utilidad en la evaluación global de la diversidad (dentro y entre razas), que es sumamente útil y debería ser tomada en cuenta a la hora de tomar decisiones para poner en práctica planes de conservación y mejoramiento animal. Finalmente, la información generada por los microsatélites puede ser integrada al Banco Global de Diversidad de los Animales Domésticos de la FAO (FAO Global Data Bank on Domestic Animal Diversity (DAD-IS)), para el conocimiento y divulgación de las razas y poblaciones en estudios biológicos.

Literatura Citada

- Aranguren-Méndez, J. A., J. Jordana, R. Avellanet y M. Torrens. 2002(a). Estudio de la variabilidad genética en la raza bovina Mallorquina para propósitos de conservación. *Revista Científica, FCV-LUZ*. XII(5): 358-366.
- Aranguren-Méndez, J. A., M. Gomez y J. Jordana. 2002(b). Potencial de los Microsatélites para la asignación de individuos dentro de raza en poblaciones a ser conservadas. V Congreso de la Sociedad Española para los Recursos Genéticos Animales y III Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animales. (SERGA & SPREGA). *El Arca*. 5: 37
- Aranguren-Méndez, J. A. y J. Jordana M. Gómez. 2002(c).

- Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* 119: 256-263.
- Aranguren-Méndez, J. A., M. Gómez y J. Jordana. 2002(d). Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. *Heredity*. 89: 207-211.
- Aranguren-Méndez, J. A., J. Jordana y M. Gomez. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics Selection and Evolution*. 33: 433-442.
- Armour, J. A., R. Neumann, S. Gobert y A. J. Jeffreys. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*. 3: 599-605.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick y R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314-331.
- Bowcock, A. M., A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minc, J. R. Kidd y L. L. Cavalli-Sforza. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*. 368: 455-457.
- Bowling, A. T. y R. S. Clark. 1985. Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses of United States. *Anim. Blood Gr. and Biochem. Genet.* 16: 93-108.
- Bowling, A. T., M. L. Eggleston-Stott, G. Byrns, R. S. Clark, S. Dileanis y E. Wictum. 1997. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Animal Genetics*. 28: 247-252.
- Bowling, A. T. 2001. Historical development and application of molecular genetic tests for horse identification and parentage control. *Livestock Production Science*. 72: 11-116.
- Cavalli-Sforza, L. L. y W. F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*. 19: 233-257.
- Chakraborty, R., L. Jin. 1993. A unified approach to study hypervariable polymorphisms: Statistical considerations of determining relatedness a population distance. In: Pena, S.D.J., Chakraborty, R., Epplen, J.T., Jeffreys, A.J. (eds). *DNA finger-printing: state and the science*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. pp. 153-175.
- Cheng, H. H. y L. B. Crittenden. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*. 73: 539-546.
- Cheng, H. H., I. Levin, R. L. Vallejo, H. Khatib, J. B. Dodgson, L. B. Crittenden y J. Hillel. 1995. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poultry Science*. 74: 1855-1874.
- Cornuet, J. M., S. Piry, G. Luikart, P. A. Stoup y M. Solignac. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*. 153: 1989-2000.
- Crow, J. F. y M. Kimura. 1970. *An introduction to population genetics theory*. New York, Evanston and London. Harper and Row Publishers. pp. 83-98.
- Dawson, R. J. G., H. L. Gibbs, K. A. Hobson y S. M. Yezerinac. 1997. Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* the yellow warbler, and their use in population studies. *Heredity*. 79: 506-514.
- Di Rienzo, A., A. C. Peterson, J. C. Garza, A. M. Valdes, M. Slatkin y N. B. Freimer. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 91: 3166-3170.
- Dodgson, J. B., H. H. Cheng y R. Okimoto. 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science*. 76: 1108-1114.
- Eding, H. y G. Laval. 1999. Measuring genetic uniqueness in livestock. In: Oldenbroek, K. (Ed.). *Genebanks and the management of farm animal genetic resources*. IDO-DL press. The Netherlands, pp. 33-58.
- Eisen, J. A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D., Schlotterer, C. (Eds.). *Microsatellites Evolution and Applications*. Cap. 4, pp.34-48. Oxford University Press, New York.
- Estoup, A. y J. M. Cornuet. 1999. Microsatellite evolution : inferences from population data. En: Goldstein, D. and Schlotterer, C. (Eds.). *Microsatellites Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York. Cap. 5, pp.49-65.
- Estoup, A., L. Garnery, M. Solignac y J. M. Cornuet. 1995. Microsatellite variation in honey bee *Apis mellifera* L. populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*. 140: 679-695.
- Farid, A., E. O'really, C. Dollard y C. R. Kelsey Jr. 2000. Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. *Canadian Journal of Animal Science*. 80: 9-17.
- Forbes, S. H., J. T. Hogg, F. C. Buchanan, A. M. Crawford y F. W. Allendorf. 1995. microsatellite evolution in congeneric mammals: Domestic and Bighorn sheep. *Molecular Biology and Evolution*. 12: 1106-1113.
- Goldstein, B. D. y C. Schlotterer C. 1999. *Microsatellites evolution and applications*. Oxford University Press, New York, 352pp.
- Goldstein, D. B., A. Ruiz-Linares, L. L. Cavalli-Sforza y M. W. Feldman. 1995. Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 92: 6723-6727.
- Hancock, J. 1999. Microsatellites and other simple sequence: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein D., Schlotterer C. (eds.). *Microsatellites evolution and applications*, Oxford University Press, New York, pp. 1-10.
- Hardy, G. H. Mendelian proportion in a mixed population. *Science*. 28: 49-50. 1908.
- Ishida, N., T. Hasegawa, K. Takeda, M. Sakagami, A. Onishi, S. Inumaru, M. Komatsu y H. Mukoyama. 1994. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics*. 25: 215-221.
- Jamieson, A. 1994. The effectiveness of using codominant polymorphic allelic series for 1 checking pedigrees and 2 distinguishing full-sib pair members. *Animal Genetics*. 25(Suppl. 1): 37-44.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson y S. L. Thein. 1985. Hypervariable «minisatellite» regions in human DNA. *Nature*. 314: 67-73.
- Jones, A. G., S. Östlund-Nilsson y J. C. Avise. 1998. A microsatellite assessment of sneaked fertilizations and eggs thievery in the fifteen-spined stickleback. *Evolution*. 52: 848-858.
- Jordana, J., P. Folch y J. A. Aranguren. 2001. Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalanian donkey breed. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 118: 57-63.
- Jordana, J., P. Folch y A. Sanchez. 1999. Genetic variation protein markers and microsatellites in endangered Catalanian donkeys. *Biochemical System Ecology*. 27: 791-798.
- Kantanen, J., I. Olsaker, L. E. Holm, S. Lien, J. Vikki, K. Brusgaard, E. Eythorsdottir, B. Danell y S. Adalsteinsson. 2000. Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *Journal of Heredity*. 91: 446-457.
- Kwok, P., Q. Deng, H. Zakeri y D. A. Nickerson. 1996. Increasing the information content of STS based genome maps: Identifying polymorphism in mapped STSs. *Genomics*. 23: 138-144.
- Levin, I., L. Santagelo, H. Cheng, B. Crittenden y B. Dodgson. 1994. An autosomal genetic linkage map of the chicken. *The Journal of Heredity*. 85: 79-85.
- Litt, M. y J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*. 44: 397-401.
- Loftus, R. T., D. E. Machugh, D. G. Bradley, P. M. Sharp y P. Cunningham. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 91: 2757-2761.
- Mullis, K. B., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn y H.

- Erlach. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
- Mundy, N. I., y D. S. Woodruff. 1996. Polymorphic microsatellite markers in the loggerhead shrike, *Lanius ludovicianus*, isolated from a library enriched for CA repeats. *Molecular Ecology*. 5: 811-813.
- Murray, B. W. 1996. The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. [Http://www.helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html](http://www.helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html)
- Nagamine, Y. y M. Higuchi. 2001. Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 118: 101-109.
- Nauta, M. J. y F. J. Weissing. 1996. Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics*. 143: 1021-1032.
- Nei, M. 1972. Genetic distances between populations. *American Naturalist*. 106: 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 70: 3321-3323.
- Nei, M., F. Tarima y T. Tateno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal Molecular and Evolution*. 19: 153-170. In: Nei, M. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York. 1987.
- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-233.
- Neuman, K. y J. H. Wetton. 1996. Highly polymorphic microsatellites in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Molecular Ecology*. 5: 307-309.
- Paetkau, D., W. Calvert, I. Stirling y C. Strobeck. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*. 4: 347-354.
- Peelman, L. J., F. Mortiaux, A. Van Zeveren, A. Dansercoer, G. Mommens, F. Coopman, Y. Bouquet, A. Burny, R. Renaville y D. Portetelle. 1998. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Animal Genetics*. 29: 161-167.
- Ponsuksili, S., K. Wimmers, F. Schmoll, P. Horst y K. Schellander. 1999. Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in Chicken. *The Journal of Heredity*. 90: 656-659.
- Prevosti, A., J. Ocana y G. Alonzo. 1975. Distances between population for *Drosophila subobscura* based on chromosome arrangement frequencies. *Theoretical Applied Genetics*. 45: 231-241.
- Primmer, C. R. y H. Ellergren. 1998. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*. 15: 997-1008.
- Rannala, B. y J. Mountain. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 94: 9197-9201.
- Renwick, A., L. Davinson, H. Spratt, J. Patrick-King y M. Kimmel. 2001. DNA dinucleotide evolution in Humans: fitting theory to facts. *Genetics*. 159: 737-747.
- Reynolds, J., B. S. Weir y C. C. Cockerham. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. *Genetics*. 105: 767-769.
- Rochambeau, H., F. Fournet-Hanocq y J. Vu Tien Khang. 2000. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann. Zootech.* 49: 77-93.
- Rogers, J. S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. En: *Studies in Genetics VII*. University of Texas Publication 7213, pp. 145-153.
- Ruane, J. A. 1999. Critical review of the value of genetic distance studies in conservation of animal genetic resources. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 116: 317-323.
- Saitbekova, N., C. Gaillard, G. Obexer-Ruff y G. Dolf. 1999. Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Animal Genetics*. 30: 36-41.
- Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
- Schlotterer, C. y D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. 20: 211-215.
- Takezaki, N. y M. Nei. 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. 144: 389-399.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphism markers. *Nucleic Acids Research*. 12: 4127-4138.
- Tautz, D. y C. Schlotterer. 1994. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development*. 4: 832-837.
- Thaon d'Arnoldi, C., J. L. Foulley y L. Olliver. 1998. An overview of the Weitzman approach to diversity. *Genetics Selection and Evolution*. 30: 149-161.
- Tivang, J. G., J. Nienhuis y O. S. Smith. 1994. Estimation of sampling variance of molecular data using the bootstrap procedure. *Theoretical and Applied Genetics*. 89: 259-264.
- Vance, J. F. y K. M. Othmane. 1998. Methods of genotyping. In: Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A. eds. *Approaches to gene mapping in complex human diseases*. A John Wiley & Son, Inc., Publication. NY. pp 213-228.
- Vanhala, T., M. Tuiskula-Haavisto, K. Elo, J. Vilkkilä y A. Maki-Tanila. 1998. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science*. 77: 783-790.
- Vignal, A., M. Milan, M. Sancristobal y A. Eggen. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetic Selection and Evolution*. 34: 275-305.
- Weber, J. L. y P. E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.
- Weber, J. L. y C. Wong. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*. 2: 1123-1128.
- Weinberg, W. 1908. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jh. Ver. Vaterl Naturk.* 64: 369-382.
- Weir, B. S. 1990. Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, INC. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 377 p.
- Weir, B. S. 1996. Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, INC. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 283 p.
- Weitzman, M. L. 1992. On diversity. *The Quarterly Journal of Economics*. 107: 363-405.
- Weitzman, M. L. 1993. What to preserve? An application of diversity theory to crane conservation. *The Quarterly Journal of Economics*. 108: 157-183.
- Wright, S. 1965. Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*. 19: 395-420.
- Zapata, C. 1987. La variabilidad genética de las poblaciones. En: Espinosa de los Monteros, J., Labarta, U. (Eds.). *Genética de la acuicultura*. pp. 33-57. Caicyt-Feuga, Madrid.