

CAPÍTULO 5

Marcadores Genéticos: Introducción al análisis y su aplicación en diversas áreas biológicas

*Egle Etel Villegas Castagnasso, Diego Manuel Posik
y Julián Alejandro Crespi*

Los marcadores polimórficos se han utilizado desde hace décadas en diversas aplicaciones; comenzando con los marcadores fenotípicos, continuando por los bioquímicos y más recientemente a nivel del ADN. Su desarrollo e implementación fue acompañado por el incremento en el conocimiento de los procesos biológicos, convirtiéndose en una herramienta irremplazable para la resolución de una amplia gama de problemáticas. Actualmente pueden detectarse variaciones ínfimas en el material genético que resultan de utilidad en genética de microorganismos, vegetales y animales, siendo generalizada su utilización en las ciencias biológicas.

En este capítulo se hará referencia a marcas o diferencias moleculares observables con efectos a distintos niveles del flujo de la información genética, que pueden ir desde la propia secuencia del material hereditario hasta la expresión de la misma, donde entran en juego numerosos factores.

Marcadores Genéticos: Un poco de historia

Para comenzar con el abordaje de un marcador, empezaremos con el significado de la palabra marcar, la cual hace referencia a distinguir o diferenciar. Si pensamos esto en el contexto de una población, las diferencias nos permitirán distinguir entre los individuos que la conforman y también distinguirla de otras poblaciones, según el marcador utilizado, el nivel de información que ofrece y el objetivo planteado en el análisis.

Los primeros estudios de las diferencias entre individuos, se basaban en la descripción de características morfológicas. En el caso de los animales de cría, estas diferencias se expresaban señalando detalles de su aspecto externo como son el análisis de peculiaridades fenotípicas de la cabeza y de ambos flancos del animal, en los que se destacaban características distintivas como por ejemplo el color de capa, la presencia de remolinos, manchas, marcas o alguna otra particularidad. Por su parte, en los vegetales, los estudios iniciales estaban basados también en observaciones de su fenotipo como por ejemplo la altura, color de la semilla, forma

de la hoja, textura de la vaina, morfología floral, etc. Las características mencionadas anteriormente, tanto en animales como vegetales, presentaban como limitantes la influencia ambiental, el tiempo requerido para colectar los datos y el reducido número de caracteres involucrados en este proceso. Sumado a ello, la observación personal constituía una fuente de errores involuntarios, ya que estas descripciones subjetivas eran tomadas con criterios ambiguos, por lo que resultaban ser escasamente informativas.

Posteriormente, el desarrollo de distintas técnicas de laboratorio permitió avanzar sobre los diferentes caracteres polimórficos a analizar. Haremos aquí un paréntesis, para poder introducir el concepto de polimorfismo:

En 1965, Edmund Ford define al polimorfismo como la presencia simultánea de dos o más formas discontinuas en una especie, de manera tal que la menos frecuente de ellas no puede ser mantenida únicamente por mutación. Posteriormente, en el año 1981, Luigi Cavalli-Sforza y Walter Bodner, mencionan al polimorfismo bioquímico-genético como la existencia en una misma población de dos o más alelos en un locus, cada uno con una frecuencia apreciable. En relación a esto, debemos definir cuál es el límite válido para considerar a una variante como alelo. Desde el año 1977 y con validez en la actualidad, Lucotte considera un determinado locus como polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común es igual o inferior a 0,99. Sin embargo esta definición puede considerarse arbitraria, ya que este valor puede variar según los valores muestrales (1%, 5%, etc.). En términos prácticos, se deben descartar aquellos alelos que aparezcan una única vez y que, por lo tanto, puedan considerarse producto de mutaciones espontáneas. De este modo el criterio que debe ser tenido en cuenta para considerar polimórfico a un locus sería que en la muestra poblacional haya al menos dos individuos heterocigotas para la variante.

Volviendo al problema de la ambigüedad que se presentaba en las descripciones fenotípicas, se destaca el aporte del trabajo que en el año 1901 presento Carl Landsteinner, en el cual describió la variabilidad presente en los grupos sanguíneos humanos mediante el empleo de técnicas serológicas. Así, por primera vez, los individuos se podían agrupar según un criterio objetivo acuñándose el término "marcador genético" definido sencillamente como caracteres heredables con múltiples estados (alelos) en cada carácter (locus).

En la década del 50, la electroforesis (técnica que separa moléculas por su movilidad diferencial a través de un gel sometido a un campo eléctrico) comenzó a ser utilizada en estudios de diversidad poblacional. Por ejemplo, los diferentes patrones de corrida de cada proteína son heredados como características discretas y de forma codominante. El número de genes involucrado en las mismas por lo general es reducido y la influencia ambiental baja. Estos marcadores bioquímicos permiten realizar un análisis rápido de numerosas muestras de forma simultánea, con técnicas estandarizadas y de bajo costo.

Sin embargo, debemos tener en cuenta que los distintos patrones electroforéticos detectados pueden tener una base molecular compleja que puede incluir sustituciones, inserciones y pérdidas de nucleótidos. Las diferencias también pueden ser causadas por modificaciones pre y post transcripcionales y/o traduccionales.

Entre las limitaciones de los marcadores bioquímicos están el que las muestras deben ser frescas y que el nivel de observación es fenotípico, ya que estamos analizando el polimorfismo a nivel proteico. Esto hace también que el análisis de la variabilidad estudiada quede reducido a ciertas regiones del ADN codificante que conforma entre el 5 y el 15% de la totalidad del genoma, dependiendo la especie analizada.

En 1953, el biólogo estadounidense James Watson y el físico británico Francis Crick propusieron el modelo de doble hélice del ácido desoxirribonucleico (ADN). Este descubrimiento fue seguido por otros no menos importantes, como el modelo de replicación semiconservativa de Messelson y Sthal en 1958 o el aislamiento de la ADN polimerasa por Kornberg en 1960.

La primera técnica para estimar diferencias a nivel de ADN se desarrolló en la década de 1960 y se aplicó en estudios sistemáticos y de evolución molecular. Esta metodología, conocida como hibridación de ácidos nucleicos, se basa en las propiedades termodinámicas de reasociación de las cadenas simples de ADN o ARN por el cual se combinan dos cadenas complementarias simples de ácidos nucleicos y se forma una única molécula de doble cadena por apareamiento de sus bases.

Posteriormente, en el año 1985, el genetista inglés Alec Jeffrey describió la presencia de secuencias repetitivas y en tándem que difieren de un individuo a otro. Empleando el uso de enzimas de restricción que cortan el ADN en las zonas flanqueantes a estas regiones y sometiendo a una electroforesis para separar estos fragmentos, se conforma un patrón de bandas que es propio de cada individuo.

Actualmente, los avances en biología molecular han incorporado nuevos marcadores, de naturaleza molecular y de mayor sensibilidad para detectar cambios en el genotipo de los individuos, situación que ha permitido grandes avances en el área. Esta línea de descubrimientos marcó la tendencia hacia estudios cada vez más pormenorizados, teniendo como objeto de análisis la molécula de ADN, portadora de los polimorfismos en la secuencia de nucleótidos. Este avance, sumado al desarrollo de nuevas técnicas, ha permitido identificar regiones que presentan diferencias que pueden reconocerse a diferentes niveles: entre individuos, entre especies, entre grupos taxonómicos mayores, etc. Este análisis de las diferencias a nivel de la secuencia de nucleótidos nos permite definir a un marcador genético como un *segmento de ADN que presenta un polimorfismo, con una ubicación física identificable, puesto en evidencia por técnicas repetibles y cuya herencia puede rastrearse.*

Marcadores moleculares

Acerca de su localización

A diferencia de los marcadores morfológicos y bioquímicos que sólo evidencian polimorfismos de regiones codificantes, los marcadores moleculares “señalan” diferencias tanto en regiones codificantes como no codificantes, ampliando las posibilidades de análisis a la totalidad del

genoma, por lo tanto pueden encontrarse en el ADN nuclear, mitocondrial o cloroplástico. Dependiendo de su ubicación, los marcadores moleculares proveen distinto tipo de información.

Los marcadores ubicados en los autosomas tienen herencia biparental, por lo tanto, su información provendrá en forma equitativa de ambos progenitores. La información que ellos proporcionan permite su utilización en identificación individual, análisis de parentesco o genealógicos y poblacionales, entre otros. Mientras que los marcadores ubicados en cromosomas sexuales suministrarán información de acuerdo a su modo de herencia. Por ejemplo en los mamíferos las secuencias que se encuentran en la región propia del cromosoma Y permiten rastrear el linaje paterno. Los marcadores ubicados en la región propia del cromosoma X, se transmiten biparentalmente en el caso de las hembras y uniparentalmente en el caso de los machos.

A diferencia de esto, los marcadores ubicados en las mitocondrias, dado su origen materno, nos permitirán obtener información acerca de eventos que hayan sucedido en la línea de herencia materna, así los individuos que provienen del mismo linaje materno poseen el mismo ADN mitocondrial (matrilinajes). El ADN mitocondrial (ADNmt) es circular, cerrado y de doble cadena lo que le confiere mayor estabilidad, con respecto al ADN nuclear, frente a fenómenos degradativos como los que se presentan comúnmente cuando la muestra queda expuesta a condiciones desfavorables de temperatura, pH, humedad, etc. Sumado a que hay mayor número de copias por célula (100 a 1000 veces más con respecto al ADN nuclear) es la región de elección para muestras degradadas. Por su parte, el ADN cloroplástico (ADNcp) posee las mismas características que el ADNmt, siendo también su herencia de origen materno. Recordemos que la presencia de mitocondrias y los cloroplastos se explica en la actualidad por la teoría endosimbiótica seriada.

Así, los marcadores moleculares ofrecen según su ubicación en el genoma y su modo de herencia, distintos tipos de información para su aplicación en diversas problemáticas.

Algunas técnicas empleadas en el análisis de marcadores moleculares

El circuito que sigue una muestra para evidenciar su genotipo para un marcador específico tiene distintos pasos que diferirán en su complejidad de acuerdo a determinadas variables, como pueden ser el tipo de muestra de partida y el método utilizado para su genotipificación.

En la figura 5.1 se muestran los pasos a seguir para la determinación del genotipo de un organismo, enumerando algunas técnicas utilizadas para este fin.

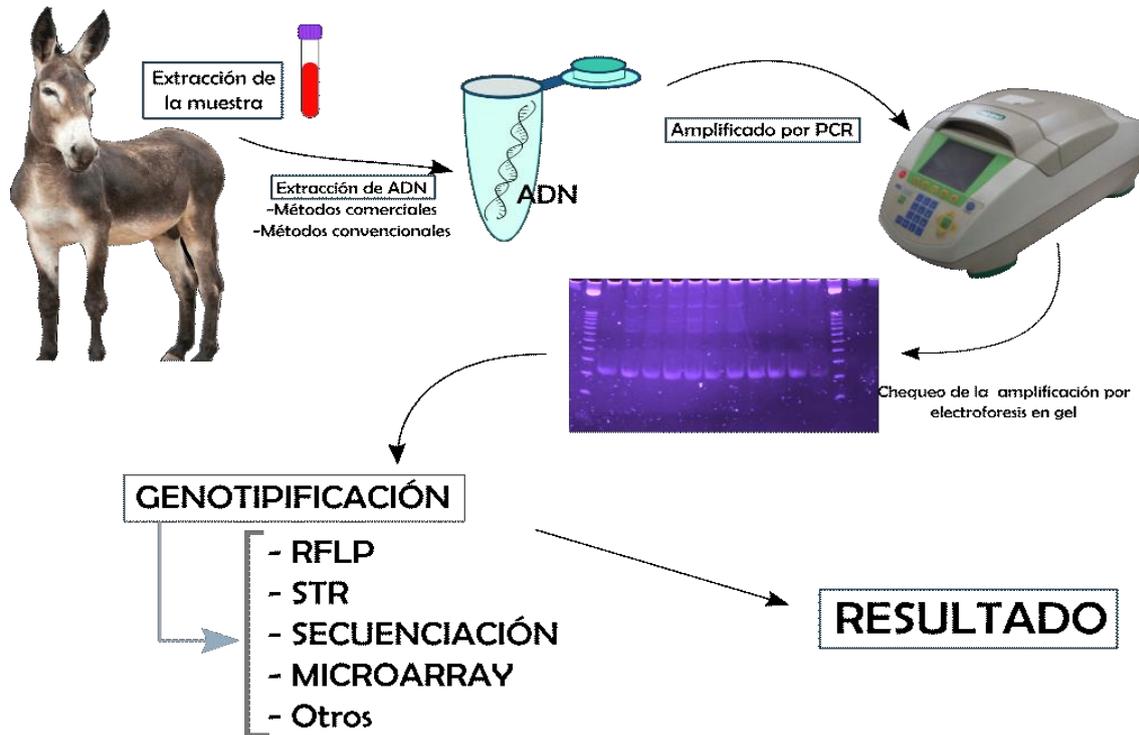


Figura 5.1. Circuito de la muestra en un laboratorio de genotipificación, desde su toma hasta la obtención del resultado según el análisis deseado y algunas de las metodologías que pueden ser empleadas.

El primer paso en estos análisis es la toma de muestra, y dependiendo de ello, será el método empleado para la conservación y la extracción del material genético. Recordemos que todas las células que componen un organismo cuentan con el mismo material hereditario; salvo contadas excepciones como son aquellas dadas por diferenciación y especialización como es el caso de los glóbulos rojos de los mamíferos. Una vez que se ha obtenido y aislado el ADN, se aumentará el número de copias del segmento que contiene al marcador genético y posteriormente se utilizará una técnica determinada que permita identificar el genotipo buscado.

En relación a la generación de numerosas copias del segmento informativo, dedicaremos un espacio a la técnica que permite su obtención. Así, la Reacción en Cadena de la Polimerasa o simplemente PCR (siglas provenientes del inglés *Polymerase Chain Reaction*) se constituyó como un aporte significativo en el desarrollo dentro del área molecular. En el año 1985, Kary Mullis desarrolló un método para multiplicar *in vitro* fragmentos definidos de ADN, a través de ciclos sucesivos de polimerización. Este método revolucionaría en corto tiempo el conjunto de técnicas de la biología molecular y su uso se extendió rápidamente tanto en la investigación básica como en el campo aplicado.

La técnica de amplificación de una región específica del genoma, se realiza con sucesivos cambios de temperatura, que involucran distintas etapas con el fin de lograr millones de copias de la región de interés. Al igual que en el proceso biológico de la replicación del ADN, esta reacción necesita de ciertos requisitos como:

- 1- **Molde:** La replicación del ADN es semiconservativa, por lo tanto es necesaria la presencia de una molécula molde sobre la que se sintetizarán las nuevas cadenas.
- 2- **Desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs):** Nucleótidos libres para poder realizar el proceso de polimerización. Las DNA polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador. Los nucleótidos se añaden como dNTPs y deben estar disponibles los cuatro en igual concentración (desoxirribonucleósidos trifosfato de adenina, citosina, guanina y timina).
- 3- **Cebador:** Los cebadores, también conocidos como “iniciadores” o en inglés “*primers*”, son cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) que se sintetizan artificialmente y que enmarcarán la zona de interés a replicar. En la PCR convencional, hay dos cebadores denominados directo (*forward*) e inverso (*reverse*), que hibridan permitiendo flanquear la zona que se desea amplificar. Así, cada cebador se asocia por complementariedad de bases con una de las cadenas de ADN y esto va a permitir que la amplificación comience a partir de cada cebador en dirección 5' - 3', multiplicándose exponencialmente durante los sucesivos ciclos de la PCR. Los cebadores brindan el extremo 3' OH libre necesario para comenzar con el proceso de polimerización, como ocurre en el proceso de replicación del ADN en la naturaleza. De este modo, se subraya la importancia del diseño de los mismos, ya que son los que le confieren la especificidad a la reacción.
- 4- **Enzima:** la ADN polimerasa es capaz de generar una copia de ADNc a partir del ADN molde. Esta enzima únicamente es capaz de añadir nucleótidos al extremo 3' OH libre aportado por el cebador y necesita un ADN molde que indique el ordenamiento en la incorporación de los nucleótidos sucesivos por complementariedad.
- 5- **Solución tampón (Buffer):** las enzimas para su acción necesitan un medio con el pH correcto, el que es proporcionado por la solución buffer. Las versiones comerciales de las polimerasas incluyen la solución tampón que requiere la enzima.

Una variable a tener en cuenta en las reacciones de amplificación por PCR, es la concentración del ion magnesio, ya que afecta varios sucesos de la reacción como son: el alineamiento de los cebadores, la temperatura de disociación de las cadenas y fundamentalmente la actividad y fidelidad de la enzima.

Habiendo enumerado los elementos necesarios para llevar adelante la PCR, analizaremos las distintas etapas que la componen. Como mencionamos anteriormente, los cambios que en la naturaleza ocurren por la intervención de varias enzimas durante la replicación del ADN, en esta reacción son reemplazados o equiparada su función por cambios de temperatura. Estos cambios se realizan con la finalidad de favorecer distintos procesos que se repiten cíclicamente y que se describen a continuación:

Desnaturalización: En esta etapa, la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C) durante un corto tiempo, en general entre 2 a 5 minutos.

Hibridación: Durante la misma, los cebadores se unen a las zonas específicas que queremos amplificar. La asociación de la cadena molde con el cebador se facilita por el descenso de la temperatura que, en esta etapa, varía entre 50-65°C y puede estimarse teniendo en cuenta la Temperatura de Melting.

Extensión o Polimerización: Aquí se produce la síntesis de una cadena sencilla, complementaria a la cadena molde en la dirección 5'-3'. Esta reacción se produce por la acción de la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxirribonucleótidos presentes en el medio siguiendo el orden marcado por la cadena molde.

A continuación, en la figura 5.2, se señalan los componentes y los pasos esenciales de la PCR:

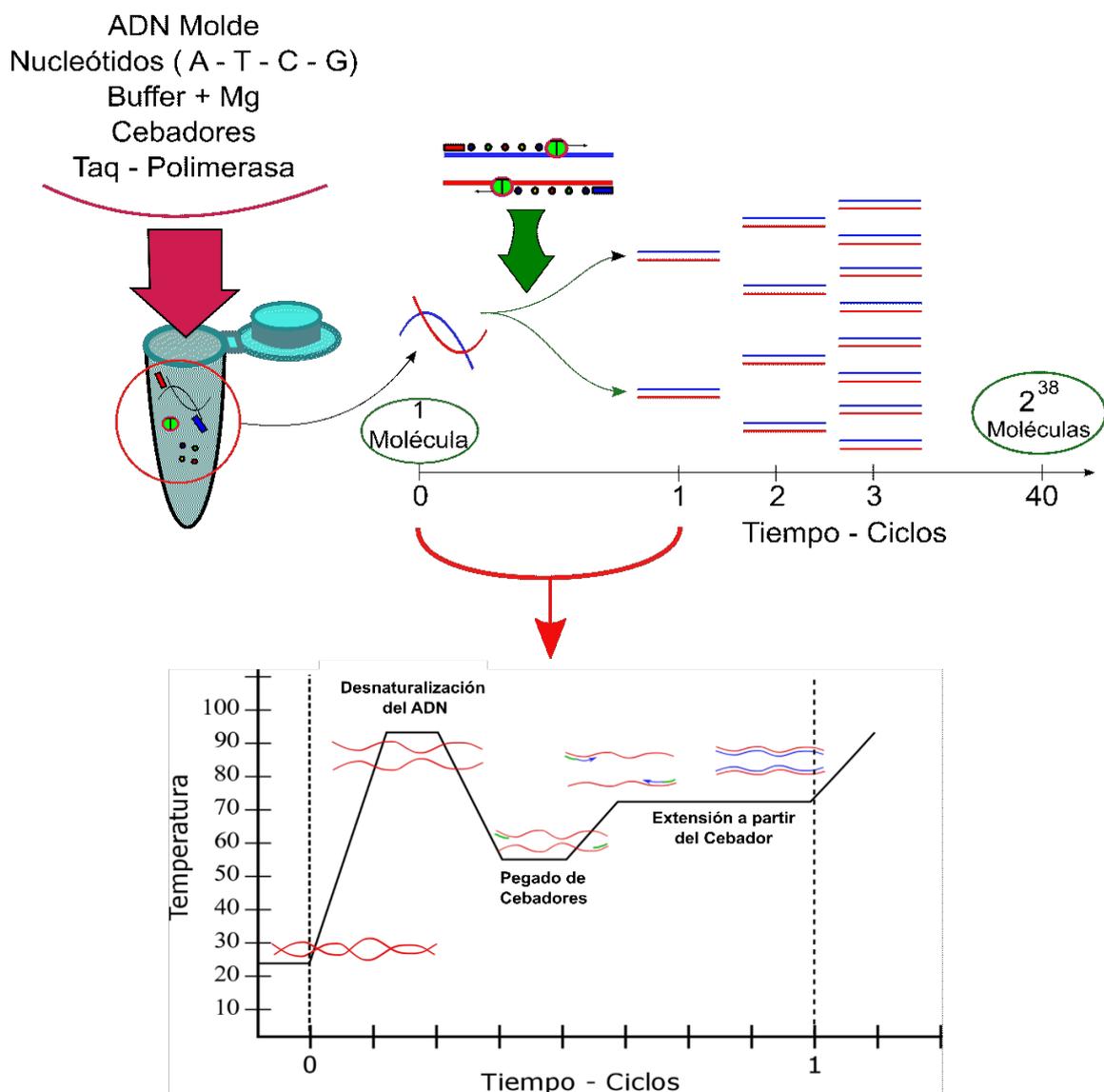


Figura 5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Componentes necesarios para la reacción, proceso de duplicación del fragmento de interés y amplificación exponencial de la reacción.

La reacción en cadena de la polimerasa se realiza en un termociclador, un aparato que permite llevar a cabo de forma automatizada y reproducible la sucesión de ciclos de temperatura. Éste se compone de un bloque térmico, cuyo calentamiento y enfriamiento se produce a gran velocidad gracias al denominado sistema Peltier.

Algunas metodologías empleadas en la genotipificación de marcadores moleculares

Retomando el concepto de marcador genético y la importancia de poder evidenciar el polimorfismo presente en ellos, se han desarrollado numerosas técnicas que permiten llevarlo a cabo. Así, las variantes de la PCR son numerosas y van desde diferenciarse por modificaciones en la propia técnica, como también del tratamiento posterior del amplicón (producto de la reacción de amplificación) en función de evidenciar la variabilidad en el fragmento de ADN seleccionado. En este capítulo nos abocaremos a describir algunas de las que consideramos como las técnicas más utilizadas en el campo de la biología.

PCR seguida de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR- RFLP)

Como lo mencionamos con anterioridad, esta técnica fue descrita por Alec Jeffreys y aplicada en la técnica de fingerprinting. El amplificado obtenido por PCR se somete a la digestión con una enzima de restricción específica. Estas enzimas cortan cuando reconocen secuencias específicas en el ADN amplificado, pudiendo generar fragmentos de distintas longitudes (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción = RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), donde cada patrón de corte se corresponderá con una variante alélica. Los distintos patrones de restricción se evidenciarán mediante electroforesis en geles, así en el caso más simple, en un organismo que no tiene el sitio donde corta la enzima se verá una única banda, mientras que en los sí tienen ese sitio, se verán dos bandas. Pueden presentarse también, más sitios de corte en una misma secuencia; los diferentes patrones obtenidos en función a ello, definirán las variantes alélicas del sistema analizado. Otros sistemas de mayor complejidad, están representados por el uso combinado de más de una enzima en la determinación de las variantes alélicas para un marcador.

Ejemplo de un caso sencillo, estaría dado por presencia/ausencia de un sitio de corte, lo que define dos alelos. Uno de ellos puede estar asociado a un carácter de interés, pudiendo utilizarse esta técnica en diferentes campos de aplicación. En la figura 5.3, se muestra el diferente patrón de corte en el exón 4 del gen Kapa Caseína (*CASK*) en bovinos, cuyas variantes se asocian a diferentes niveles de proteína en leche.

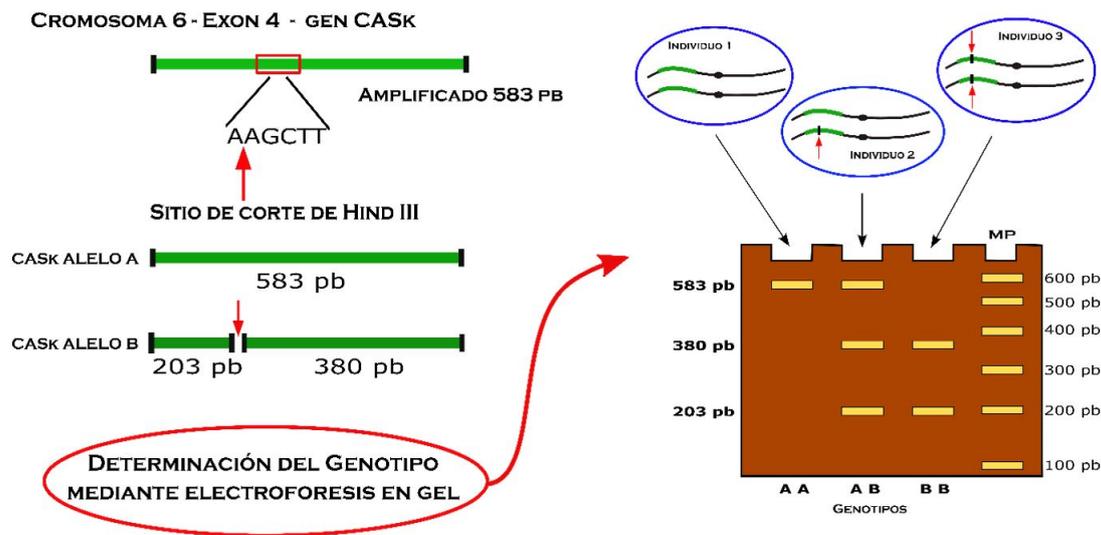


Figura 5.3. PCR- RFLP empleado para la diferenciación de variantes del gen Kapa Caseína por corte con enzima de restricción Hind III.

Secuenciación

Es una técnica que consiste en la determinación de la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN. El método de secuenciación por terminación de cadena o dideoxi ideado por Sanger está basado en el empleo de dideoxynucleótidos, que son nucleótidos que carecen del grupo hidroxilo 3' de la pentosa, de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a la cadena de ADN en crecimiento, la misma no puede continuar elongándose ya que la ADN polimerasa necesita ese hidroxilo para añadir el siguiente nucleótido.

Cada dideoxynucleótido está marcado con un fluorocromo de diferente color, así cuando los fragmentos estudiado se someten a un campo electroforético, cada posición estará representada por el color específico de su fluorocromo. Los equipos utilizados en la actualidad, realizan la corrida electroforética en capilares, en donde en un sector incidirá un láser que excitará los fluorocromos de los dideoxynucleótidos y la luz emitida por estos será captada por un detector, que mediante un programa específico determinara la base asociada a esa posición. Esto permitirá conocer la sucesión de nucleótidos en los fragmentos analizados, visualizado en un gráfico denominado electroferograma, donde cada pico de emisión de fluorescencia representa un nucleótido específico. Los pasos del proceso de secuenciación, se muestran en la figura 5.4.

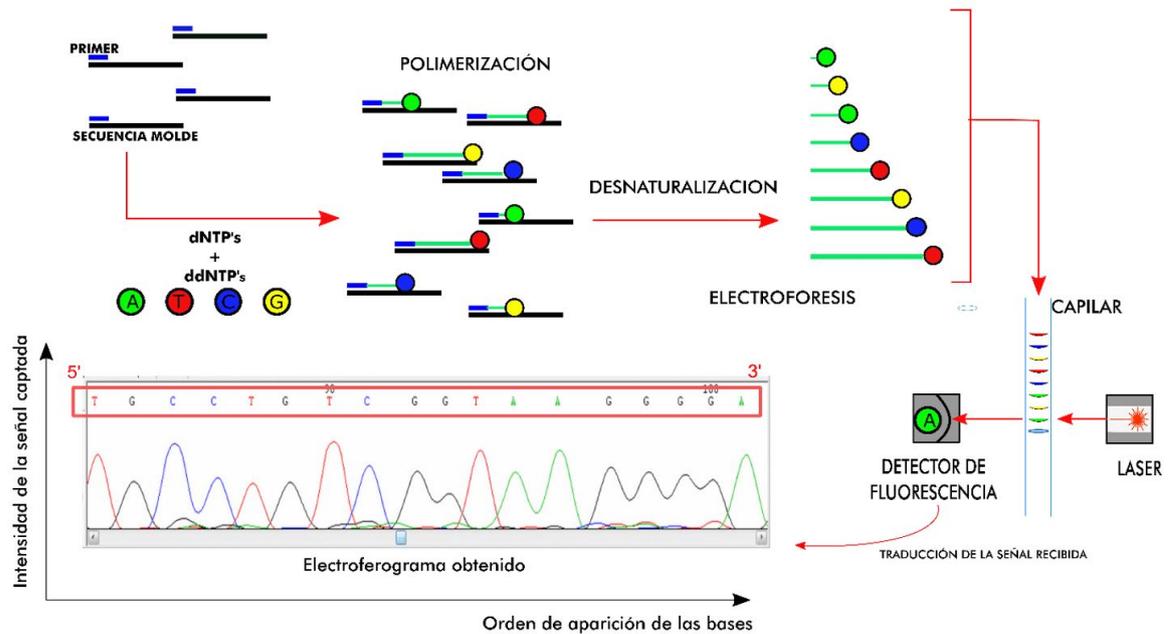


Figura 5.4. Secuenciación. Determinación de la secuencia de nucleótidos basada en la técnica de Sanger, utilizando un secuenciador automático capilar.

Detección de secuencias repetitivas: micro y minisatélites

Las secuencias micro y minisatélites forman parte del ADN no codificante, aquel que no está relacionado con las secuencias de los distintos ARN o proteínas y se hallan conformadas por repeticiones en tándem de determinadas secuencias de nucleótidos. En el caso de los microsatélites estas secuencias repetidas están formadas por un *core* (núcleo o motivo de repetición) que puede tener, en la mayoría de los casos, entre 2 a 5 nucleótidos; mientras que en el caso de los minisatélites estas repeticiones están conformadas por entre 20 a 24 nucleótidos.

La detección de los mismos involucra la amplificación de cada marcador microsatélite o minisatélite y la posterior diferenciación de las variantes de cada sistema, mediante electroforesis. Esta electroforesis al igual que en el caso de la secuenciación, se realiza por tecnología automatizada de electroforesis capilar. La diferencia entre las variantes alélicas de cada marcador está dada por el número de repeticiones del *core*, por ejemplo una variante podría definirse por cinco repeticiones sucesivas de la secuencia *core*, mientras que otro alelo podrá estar conformado por siete repeticiones. El número de repeticiones definirá el largo del fragmento amplificado, determinando su posición en la corrida electroforética (Figura 5.5 y 5.6).

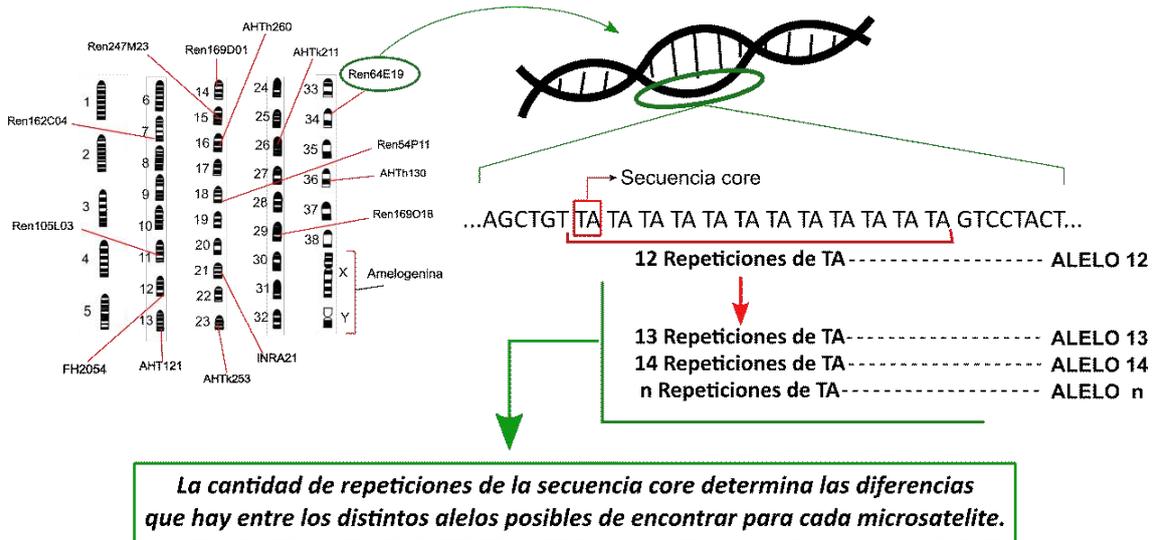


Figura 5.5. Microsatélites (STRs), ejemplo de ubicación en el genoma del perro y posibles variantes alélicas de un mismo marcador obtenidas por electroforesis capilar.

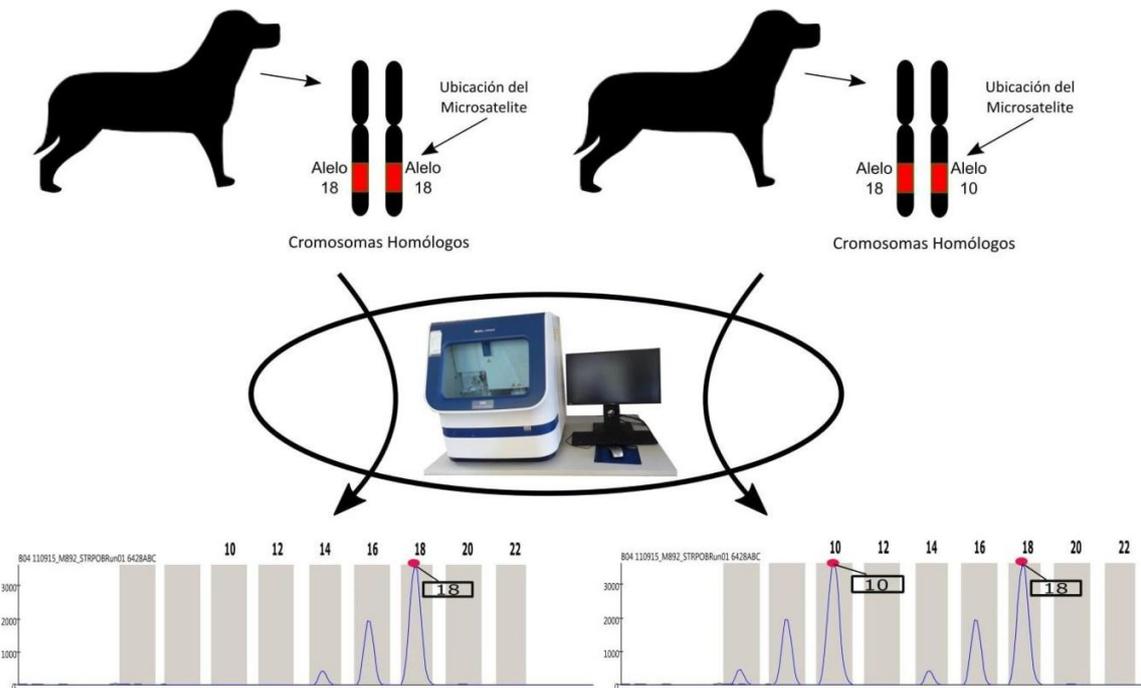


Figura 5.6. Interpretación de los resultados del análisis de un marcador microsatelite a través de electroforesis capilar, mostrando un electroferograma de un individuo homocigota y otro heterocigota.

La determinación de cada variante alélica se encuentra estandarizada de acuerdo a parámetros internacionales en las especies más estudiadas, posibilitando la comparación de resultados a nivel mundial. Estos marcadores tienen una amplia gama de aplicaciones, desde la identificación individual, estudios de filiación, caracterización de poblaciones y parámetros de diversidad, entre otros.

Detección de Polimorfismo de nucleótido simple (SNPs- Single Nucleotide Polymorphism)

Otra de las diferencias que se presentan en el genoma de los organismos está dada por el cambio de un nucleótido por otro (transición o transversión), en una posición determinada del ADN. Así, cada variante alélica de un SNPs está definida por la presencia de un nucleótido dado en una posición específica; dicha posición podrá estar ocupada por un nucleótido alternativo. Cada nucleótido alternativo en dicha posición, será definido como variante alélica. Los SNPs conforman la variación genética más común, con más de ciento cincuenta millones reportados en las bases de datos públicas.

Para evidenciar las diferencias dadas por la presencia de un nucleótido en una posición específica, existen numerosas técnicas como por ejemplo el RFLP, la secuenciación, la pirosecuenciación, la minisequenciación, etc. En la figura 5.7 se muestra la detección de variantes alélicas utilizando la secuenciación como método para evidenciarlas.

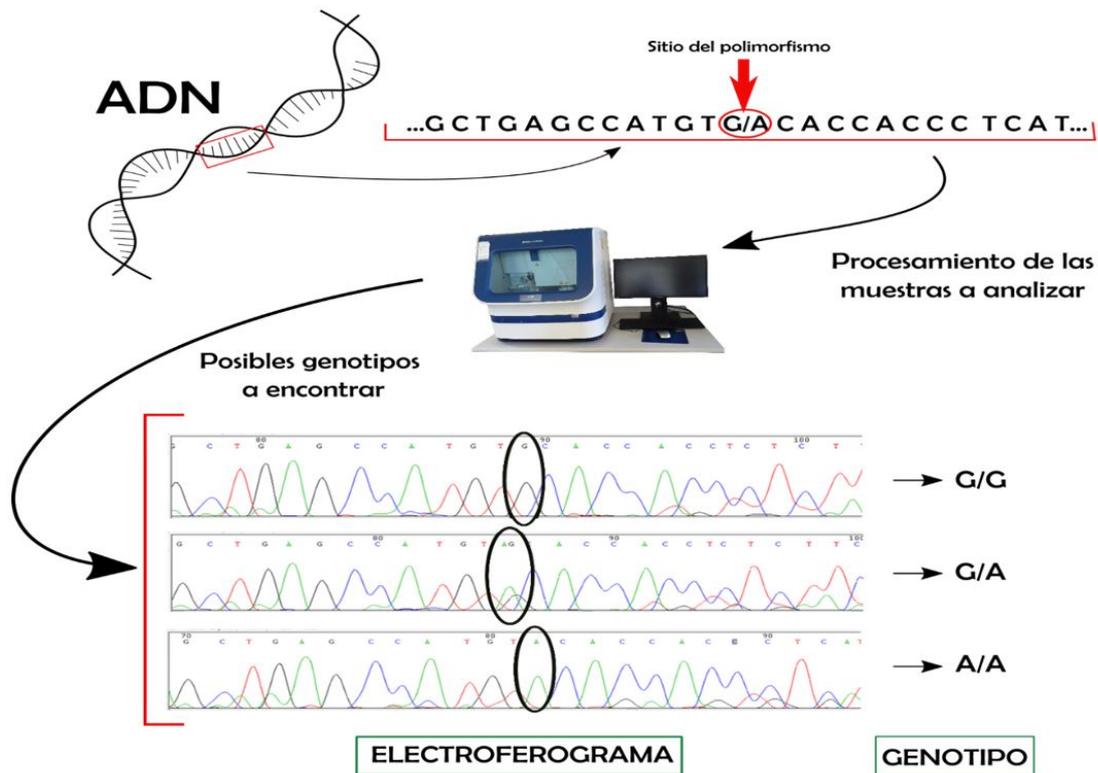


Figura 5.7. Polimorfismo de nucleótido simple (SNP). Determinación de un SNPs a través de la secuenciación de un fragmento de interés e interpretación de los posibles genotipos.

Para citar un ejemplo muy estudiado, en el caso de los humanos los SNPs forman el 90% de todas las variaciones genómicas, apareciendo aproximadamente uno cada 300 bases a lo largo del genoma. Dado que solo un pequeño porcentaje del genoma son secuencias relacionadas con la producción de proteínas, la mayoría de los SNPs se hallan fuera de las zonas codificantes. Sin embargo, los SNPs que se encuentran dentro de las regiones codificantes revisten gran importancia ya que, probablemente, pueden alterar la función biológica de las proteínas.

Una tecnología que merece una mención especial, que permite la detección de SNPs en forma masiva es la tecnología de microchip o *microarray* de ADN, que consiste en la detección de variantes alélicas por hibridación del ADN genómico de la muestra a analizar con una serie de sondas fijadas en un soporte sólido. El ADN genómico debe amplificarse y fragmentarse enzimáticamente para facilitar el proceso de hibridación. Cada una de estas sondas permite detectar SNPs informativos o diagnósticos. Las sondas están diseñadas de forma tal que llegan hasta el nucleótido anterior al sitio en donde está el SNP. Posteriormente a hibridar con el fragmento del ADN genómico se adiciona enzimáticamente una base tomando a éste último como molde. Cada base incorporada, estará identificada con un fluorocromo diferente permitiendo de este modo su reconocimiento. Así habrá una señal con uno de los fluorocromos, con el otro o con ambos en correspondencia a los genotipos de los individuos homocigotos para una variante, homocigotos para la otra variante o heterocigota respectivamente.

Como ya mencionamos, las sondas con las que hibridarán las muestras de ADN se hallan fijadas a una superficie sólida por un extremo. Esta superficie se divide en celdas, en cada una de ellas habrá sondas idénticas que mediante hibridación y posterior emisión de señal lumínica, nos permitirán determinar la variante alélica del sitio informativo a analizar en esa posición. La determinación de las variantes alélicas se realiza simultáneamente a través de la utilización de un equipo y de programas de análisis específicos. La cantidad de celdas define la densidad del microchip, yendo desde miles hasta cientos de miles, clasificándose así en *microarrays* de baja o alta densidad. En la figura 5.7 se muestra la tecnología de microchips o microarray, mostrando los diferentes pasos involucrados.

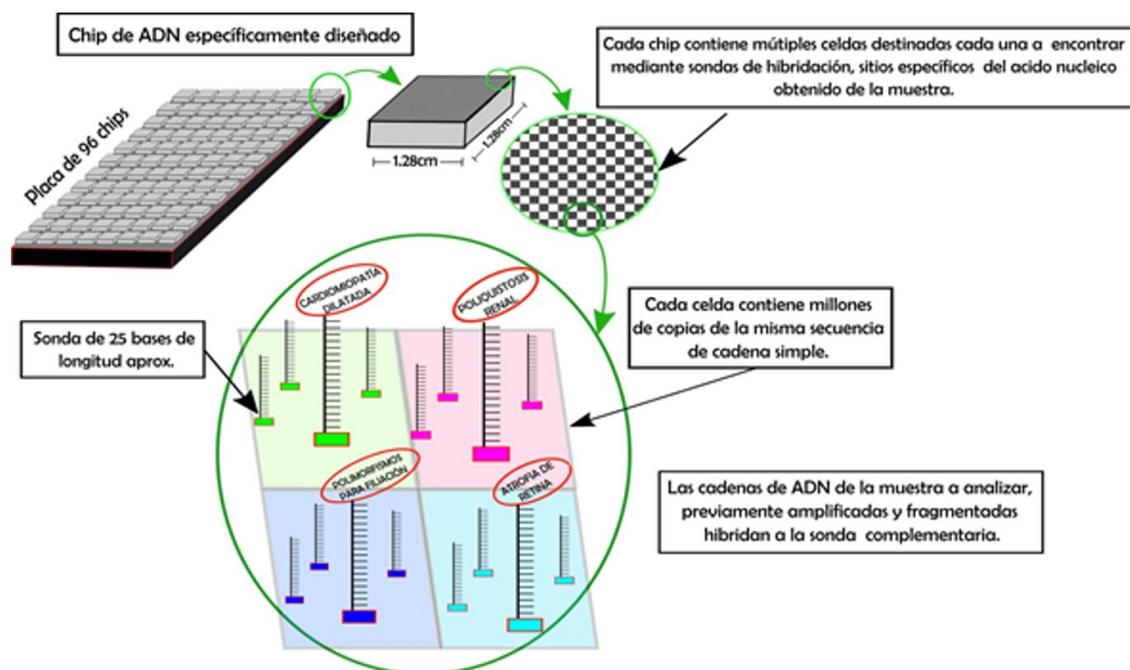


Figura 5.8. Tecnología de Microarrays. Cada chip es diseñado específicamente para detectar miles de sitios polimórficos de forma simultánea.

Esta tecnología, a diferencia de las técnicas antes descritas, permite la obtención de una muy alta cantidad de información, sobre sitios de SNPs. Si bien es una herramienta que se conoce hace muchos años, su empleo en las distintas áreas de biología se ha comenzado a utilizar recientemente.

Marcadores moleculares: algunas aplicaciones

Teniendo en cuenta las distintas herramientas tecnológicas, los tipos de marcadores moleculares, sus diferentes modos de herencia y su ubicación en el genoma, la aplicación de los mismos es muy amplia. De este modo se han constituido en elementos invaluable, que se utilizan cada vez más en diferentes disciplinas, auxiliando en el diagnóstico de enfermedades, la determinación de nuevas especies, el establecimiento de relaciones filogenéticas, el análisis de diversidad genética o el campo forense para nombrar solo algunas de ellas.

Los marcadores genéticos son ampliamente utilizados a la hora de relacionar las enfermedades heredables con su causa genética. Por ejemplo, en el caso en que una mutación en un determinado gen que altera la expresión o la función de éste, contribuyendo directamente a la manifestación de una enfermedad. En otros casos, un marcador ubicado en una secuencia próxima a un gen y el gen relacionado con una enfermedad pueden heredarse juntos por ligamiento génico; éste marcador puede servir para identificar a este gen a pesar de no estar implicado directamente en la expresión del gen. Esto muchas veces permite conocer el patrón de herencia conociendo los polimorfismos del marcador incluso cuando no conozcamos la localización precisa de ese gen. En este caso se dice que la variante alélica del marcador está asociada a la enfermedad. Aquellos marcadores que determinan una alta probabilidad de que se produzca una enfermedad son útiles como herramientas de diagnóstico.

La estabilidad del genoma hace que el genotipo para cualquier marcador se mantenga a lo largo de la vida del organismo. Este hecho define a una huella genética, que al igual que la huella dactilar, es única y las técnicas que hemos analizado con anterioridad, permiten evidenciarlas fácilmente. Esto permite la identificación individual en cualquier momento de su ciclo de vida, inclusive a partir de sus rastros biológicos.

En el caso de determinar el perfil genético de un individuo, los marcadores más utilizados son los microsatélites con ubicación nuclear. La tecnología de electroforesis capilar y la utilización de cebadores marcados con distintos fluorocromos, permiten establecer el genotipo de numerosos marcadores de este tipo en forma simultánea. Recordemos que los microsatélites son altamente polimórficos, presentando en general más de seis variantes alélicas por marcador. La combinación de los distintos genotipos para los diferentes marcadores, genera un perfil individual altamente específico. Esta característica es utilizada también para casos de filiación, donde cada progenitor biológico proporciona una de las dos variantes alélicas presentes en su descendencia, para cada marcador. El análisis de filiación, es utilizado también para mantener la fidelidad de los libros genealógicos, fundamen-

tales para realizar un seguimiento de los linajes, aplicar programas de selección y de mejora según la especie. Este tipo de estudio está acompañado de un soporte estadístico que permite indicar la confiabilidad del análisis realizado.

Los marcadores moleculares constituyen herramientas indispensables para determinar la variación genética y la biodiversidad con un alto grado de precisión y reproductibilidad. Por ejemplo a la hora de realizar el manejo de especies amenazadas en donde hay un evidente empobrecimiento genético suele ser necesario conocer la variabilidad poblacional, de forma de evitar la endogamia y una mayor pérdida de variación genética. La elección de los marcadores a utilizar esta en función a los objetivos, al tipo de información que se busca y de las facilidades disponibles.

Las aplicaciones de las técnicas de ADN en antropología permiten el análisis de patrones de variabilidad tanto en humanos como en organismos no humanos para poner a prueba hipótesis sobre el origen del hombre y su comportamiento ancestral. El uso de marcadores de ADN permite por ejemplo la reconstrucción de las relaciones de parentesco de los individuos hallados en un sitio arqueológico, de las interacciones con otras poblaciones, el estatus social o los patrones diferenciales de enfermedad o mortalidad por sexo o edad. También se pueden analizar restos no humanos que pueden brindar información como la diversidad de especies, revelando los patrones de obtención de alimentos, trazar la domesticación de las especies o aportar datos sobre enfermedades ancestrales. En base a los restos no humanos es posible reconstruir los ambientes e inferir el movimiento humano y de especies comensales así como los movimientos estacionales.

Muchas veces es preciso determinar el origen de un material biológico que por su procesamiento o por ser solo una parte del mismo hacen imposible su identificación por su morfología u otros métodos tradicionales. Estos pueden ser partes de animales (fragmentos de cuerno de rinoceronte, marfil, huesos de tigre, etc.) o plantas (semillas o compuestos extraídos de plantas exóticas como aceites y resinas). Es común que estos análisis están asociados al tráfico de especies silvestres con el fin de identificar la especie a la que pertenecen o determinar su origen geográfico. Estos materiales biológicos también pueden ser alimentos en los que se quiere determinar con qué especie de animal o vegetal están elaborados así como conocer el origen biológico de algún producto farmacéutico que podría estar producido a partir de especies no permitidas para su uso en humanos o que podrían generar reacciones adversas para la salud.

En casos donde el objetivo sea la determinación de la especie, se suelen utilizar genes que presentan escasa variabilidad dentro de la especie y alta variabilidad genética entre especies.

Una aplicación de los marcadores genéticos está asociada a la sistemática de especies presentes en nuestro planeta. Por ejemplo, los “Código de barra de la vida” incluyen a varios proyectos internacionales (*Barcode of Life* -BOLD, *Consortium for the Barcode of Life* -CBOL) que tienen por finalidad identificar las especies y otros taxa con secuencias únicas de ADN y consisten en crear una colección pública de secuencias de referencia obtenidas de los “ejemplares tipo” de todas las especies de seres vivos. Las secuencias corresponden a una región estandarizada y corta de ciertos genes que tienen variabilidad entre los taxa. Para animales

este locus corresponde a un fragmento de aproximadamente 650 pb del extremo 5' del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (*COI*). Para el resto de los organismos se usan uno o más genes. Por ejemplo, para los hongos el espaciador transcrito interno del rRNA (*Internal transcribed spacer rRNA –ITS*), para las plantas los genes cloroplásticos ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (*RuBisCO*) y maturasa K (*matK*) y para las bacterias el rRNA 16S. Así, los códigos de barras genéticos tienen un sin número de utilidades entre las que podemos nombrar la de identificar nuevas especies, asociar estados larvales con adultos de una misma especie, diferenciar especies crípticas, detectar especies invasoras como también colaborar en el manejo de especies amenazadas, en la protección ambiental o suministrar información de uso en biología evolutiva o estudios de la biodiversidad.

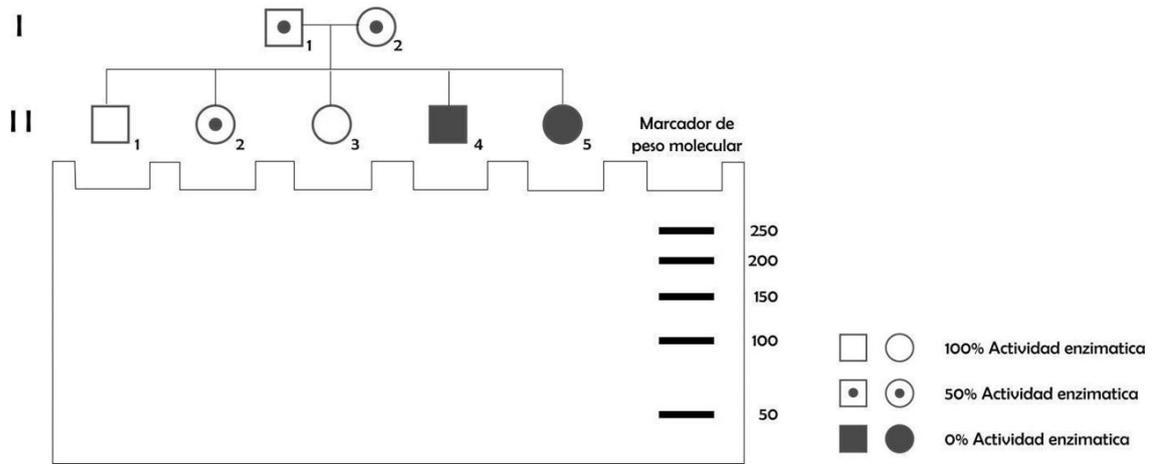
Cada vez se hace más común que en nuestra vida diaria incorporemos el uso de términos como gen, ADN, diversidad genética, genoma, marcadores moleculares, prueba del ADN y otros; dada la importante aplicación que tienen en la actualidad en diversas áreas (medicina, botánica, conservación, agricultura, etc.), estos términos se pueden ya leer o escuchar a diario, fuera del ámbito científico.

Ejercicios

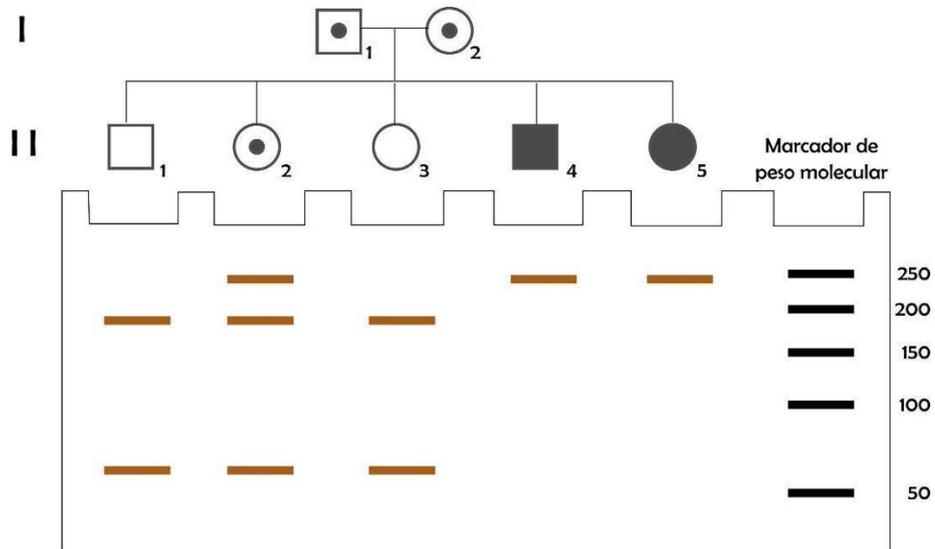
1- Una enfermedad hereditaria congénita propia de algunas caninas, se caracteriza por presentar variaciones en la actividad de una enzima (A) de los glóbulos rojos, afectando la vida media de estos. La mutación que produce la enzima defectuosa se debe a un cambio puntual en la posición 324 del segundo exón donde cambia una C por T. Este cambio permite el diagnóstico molecular a través de la técnica de PCR-RFLP. Con la enzima de restricción *Crspl* podemos diferenciar el alelo normal (C) del gen, el que presenta el sitio de reconocimiento y con su acción se generan dos fragmentos, uno de 40 pb y otro de 140 pb. Sin embargo cuando está presente el alelo mutado (T) no se presenta el sitio de reconocimiento de la enzima, quedando el fragmento amplificado con el tamaño original de 180 pb. Las mediciones de la actividad enzimática de cada genotipo es la siguiente:

- a) Los animales **T/T**, no presentaban actividad enzimática.
- b) Los animales **C/T**, presentaban el 50% de la actividad enzimática.
- c) Los animales **C/C** presentaban el 100 % de la actividad enzimática.

Teniendo en cuenta el siguiente pedigrí, realice el esquema de los patrones electroforéticos de los individuos de la segunda generación.



Resolución:



2- Para resolver un litigio sobre la paternidad de un potrillo, llegan al laboratorio Forense de la Facultad de Veterinaria-UNLP, cuatro muestras de sangre. Las mismas pertenecen al potrillo en cuestión, la yegua madre (de la que se tiene certeza sobre su vínculo biológico) y dos padrillos para los que debe resolverse cuál es el progenitor biológico del potrillo. Con el fin de poder resolver este caso, se extrae el ADN de cada muestra, se amplifican los marcadores tipo microsatélites y se realiza el análisis pertinente. De este modo, se determinó que uno de los padrillos era el progenitor biológico del potrillo (Padrillo 1), mientras que el restante quedaba excluido como tal (Padrillo 2).

En la siguiente tabla se muestran los animales en cuestión y los microsatélites utilizados. Complete los genotipos de cada animal para cada marcador de tal manera que sea coincidente con el resultado antes mencionado.

	Microsatélite							
Animal	HMS2	HMS3	ASB2	HTG6	HTG7	LEX52	TKY333	AHTG4
Padrillo 1	A-A							
Padrillo 2								
Yegua				K-N				
Potrillo	A-D			K-N				

Resolución: El genotipo del potrillo está conformado, para cada microsatélite, por dos alelos cada uno proveniente de cada uno de los progenitores. Al ser la maternidad segura, el alelo que aporta la madre no es cuestionado, por lo tanto se completará el genotipo para cada marcador teniendo en cuenta que uno deberá coincidir con uno de los dos alelos presentes en el genotipo de la madre (alelo obligado). El alelo restante del potrillo provendrá del padre biológico, en este caso particular deberá estar presente en el padrillo 1. En el caso que el alelo no materno de la cría, no pueda explicarse por su presencia en el padrillo, hará que ese animal quede excluido como progenitor biológico de esa cría. Teniendo en cuenta eventos de mutación, la exclusión se dará cuando se presente discordancia (*mismatch*) en 2 o más marcadores, caso en el cual el padrillo quedará excluido como padre biológico de esa cría.

	Microsatélite							
Animal	HMS2	HMS3	ASB2	HTG6	HTG7	LEX52	TKY333	AHTG4
Padrillo 1	A-A	K-L	O-O	K-K	R-T	G-H	I-I	M-N
Padrillo 2	B-B	L-M	R-S	K-L	S-S	H-J	I-J	N-O
Yegua	D-E	L-L	P-R	K-N	R-R	I-K	I-J	M-M
Potrillo	A-D	L-L	O-P	K-N	R-R	G-I	I-I	M-N

3- A continuación se presenta el alineamiento de las secuencias del Citocromo b (*Cytb*) ubicado en el ADN mitocondrial de tres especies de mamíferos. Con el fin de poder diferenciar qué muestras provienen de cada especie, se utilizan sitios polimórficos puntuales a lo largo de la secuencia que define a cada especie (haplotipo). Determine en estos tres ejemplos cuáles son estos sitios informativos.

```

ciervo      CATGAGGACAAATATCATTTCTGAGGAGCAACAGTCATTACCAACCTTCTCTCAGCAATTC 60
búfalo     CATGAGGACAAATATCATTTCTGAGGGGCAACAGTCATCACCAACCTTCTCTCAGCAATCC 60
vaca       CATGAGGACAAATATCATTTCTGAGGAGCAACAGTCATCACCAACCTTCTATCAGCAATCC 60

ciervo     CATATATTGGTACAAACCTAGTCTGAATGGATCTGAGGGGGCTTTTCAGTAGACAAAGCAA 120
búfalo     CATAATTGGTACAAGTCTGGTTGAATGAATTTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAAGCAA 120
vaca       CATAATCGGCACAAATTTAGTCTGAATGAATCTGAGGCGGATTCTCAGTAGACAAAGCAA 120

```

ciervo	CCCTAACCCGATTTTTTCGCTTTCCACTTTATTCTCCCATTTATCATCGCAGCACTCGCTA	180
búfalo	CCCTCACCCGATTCTTCGCATTTCACTTCATCCTCCCATTATTATCGCAGCACTTGCAA	180
vaca	CCCTTACCCGATTCTTCGCTTTCCATTTTATCCTTCCATTTATCATCATAGCAATTGCCA	180
ciervo	TAGTACACTTACTCTTCTCCTTCACGAAACAGGATCTAACAAACCCACAGGAATTCCATCAG	240
búfalo	TAGTCCACCTATTATTCTCCACGAAACAGGATCCAACAACCCACAGGAATTCCATCAG	240
vaca	TAGTCCACCTACTATTCTCCACGAAACAGGCTCCAACAACCCACAGGAATTCCCTCAG	240

Resolución: Se resaltan en color los sitios que presentan diferencias entre las especies analizadas. La combinación de todos estos sitios polimórficos para cada especie conforma el haplotipo propio de ésta.

ciervo	CATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTCATACCAACCTCTCTCAGCAATTC	60
búfalo	CATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTCATACCAACCTCTCTCAGCAATTC	60
vaca	CATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTCATACCAACCTCTTATCAGCAATTC	60
ciervo	CATATATTGGTACAAACCTAGTGAATGATCTGAGGGGGTTTTCAGTAGACAAAGCAA	120
búfalo	CATACATTGGTACAAAGTCTCGTGAATGATTTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAAGCAA	120
vaca	CATACATCGGCACAAATTTAGTGAATGATCTGAGGGGGATTCTCAGTAGACAAAGCAA	120
ciervo	CCCTAACCCGATTTTCGCTTTCCACTTTATTCTCCCATTTATCATCGCAGCACTCGCTA	180
búfalo	CCCTCACCCGATTCTTCGCATTTCACTTCATCCTCCCATTATTATCGCAGCACTTGCAA	180
vaca	CCCTTACCCGATTTTCGCTTTCCATTTTATCCTTCCATTTATCATCATAGCAATTGCCA	180
ciervo	TAGTACACTTACTCTTCTCCTTCACGAAACAGGATCTAACAAACCCACAGGAATTCCATCAG	240
búfalo	TAGTCCACCTATTATTCTCCACGAAACAGGATCCAACAACCCACAGGAATTCCATCAG	240
vaca	TAGTCCACCTACTATTCTCCACGAAACAGGCTCCAACAACCCACAGGAATTCCCTCAG	240

Referencias

- Arif, I. A. & Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, (32.1), 9–17.
- Cavalli-Sforza L. L. & Bodmer, W. F. (1965). *Genética de las poblaciones humanas*. Editorial Omega. 1981. Barcelona. Ford EB: *Polymorphism. Biology Reviews*, (20), 73 - 88.
- Giovambattista, G. & P. Peral Garcia. (2010). *Genética de Animales Domésticos*. Buenos Aires. Editorial Intermédicas.
- Kaestle F. & Horsburgh K. A. (2002). Ancient DNA in Anthropology: Methods, Applications, and Ethics. *Yearbook of Physical Anthropology*, (45), 92–130.
- Landsteiner, K. (1901). Ueber heterogentisches antigen und haptén. *Biochem. Z.*, (119), 294-306.
- Lucotte, G. (1977). *Le polymorphisme biochimique et les facteurs de son maintien*. Editorial Masson, Paris.
- Rocha, D., Gut, I., Jeffreys, A., Kwok, P., Brookes, A. & Chanock, S. (2006). Seventh international meeting on single nucleotide polymorphism and complex genome analysis: 'ever bigger scans and an increasingly variable genome'. *Hum Genetic*. (119-4), 451-456.
- Telenti, A., Pierce, L., Biggs, W., et al. (2016). Deep sequencing of 10,000 human genomes. *PNAS*, (42). 11901-11906.