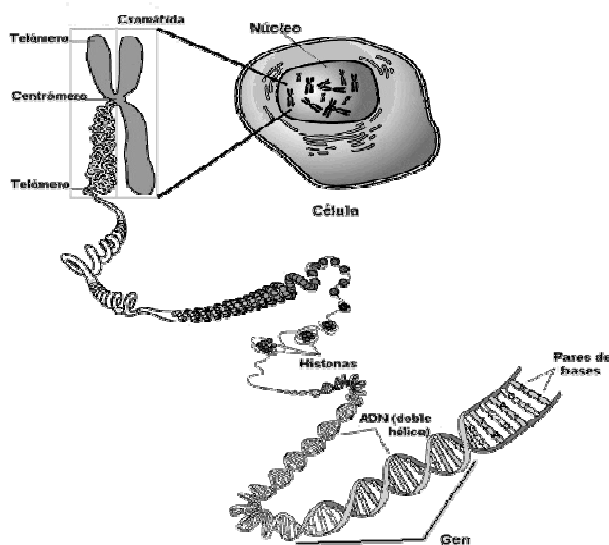


# MARCADORES GENÉTICOS

El genoma no solamente contiene genes, sino también secuencias no codificantes que sin una función específica definida, pueden ser utilizados como puntos de marca o anclaje (marcadores) cuando éstas se encuentran unidas o cercanas a las secuencias propias de los genes. Un marcador es una entidad genética que manifiesta polimorfismo y se hereda de manera mendeliana, o es lo mismo decir, un locus con una variación detectable demostrada experimentalmente.

La variación de naturaleza cuantitativa y de origen genético dentro de las poblaciones se presenta en dos formas básicas: mutantes raros y polimorfismo genético. Si la variante más escasa aparece con una frecuencia menor del 1% se denomina mutante raro, pero si ésta es mayor que este valor se trata de un polimorfismo genético. La variabilidad genética es un atributo que no puede ser exhaustivamente medido.



Es imposible examinar cada gen en cada individuo de una especie para obtener una enumeración completa de la variación genética de la especie; sin embargo, si se toma una muestra de una población es posible estimar su variabilidad genética al utilizar un carácter o marcador que propicie la medición de dicha variabilidad.

Una vez que se identifican los genes y sus "marcas", y su correlación con una característica productiva (por ej. incremento de peso, producción de leche, carne magra), se consigue identificar lo que se denomina loci para una característica o rasgo cuantificable (QTL por sus siglas en inglés: Quantitative Trait Loci). Los QTL se pueden utilizar para llevar a cabo la genotipificación de individuos en las poblaciones de especies animales, entre los que se puede detectar a aquellos que son portadores de estos marcadores para ser seleccionados y con ello desarrollar programas de selección. A este tipo de selección se la ha denominado selección asistida por marcadores (SAM) y selección asistida por genes (SAG).

Hasta mediados de la década de los 60', los marcadores usados en genética y mejora animal estaban controlados por genes asociados a caracteres polimórficos, en general fáciles de identificar visualmente (fenotipo), pero solo un pequeño número de esos **marcadores morfológicos** permitían encontrar asociaciones significativas entre estos y los caracteres con importancia económica.

Por sus limitaciones surgieron los **marcadores isoenzimáticos** o marcadores de proteínas, que eran accesibles a un mayor número de especies y brindaban mejores resultados. Se expresan en forma **codominante**, son compatibles con el normal funcionamiento de la proteína y **son relativamente abundantes**, pero son técnicas **muy caras y dificulta los proyectos de mapeos**, además **no más del 3% del ADN genómico es finalmente traducido a proteínas y que sólo unas pocas de estas pueden mutar sin alterar la viabilidad de los animales**. Los primeros marcadores fueron los grupos sanguíneos y luego otros marcadores polimórficos bioquímicos o las inmunoglobulinas pero presentaban escasa variantes polimórficas lo que limitó su uso y aplicaciones. Dejaron de utilizarse y aparecen así nuevos marcadores moleculares.

## MARCADORES MOLECULARES

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular aparecieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel de ADN: **los marcadores genéticos moleculares** basados en ADN que sirven de referencia para detectar la transmisión de un segmento de cromosoma de una generación a otra.

El término marcador se utiliza aquí en el sentido de marcador genético, y muchas veces se lo utiliza como sinónimo de marcador de locus; un locus polimórfico que indica el

Un marcador es un polimorfismo, pero no siempre un polimorfismo sirve de marcador.



genotipo del individuo que lo lleva (con este propósito se utilizan marcadores en genética de poblaciones), o el genotipo de uno o de varios loci ligados al marcador. Inicialmente el descubrimiento de las enzimas de restricción permitió el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción. Posteriormente, con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se desarrollaron nuevos métodos de detección de marcadores moleculares.

Los **marcadores "ideales"** cumplen una serie de características, entre las que se encuentran:

- Elevada capacidad de detectar altos niveles de polimorfismo,
- Alta heredabilidad,

- Gran capacidad para acceder a todas las regiones del genoma,
- Independencia del estado físico y de desarrollo del individuo,
- Facilidad de obtención,
- Detección por métodos económicos,
- Independencia de las condiciones ambientales y
- La posibilidad de determinación en cualquier tipo de células que contenga núcleo.

Estas constituyen algunas de las ventajas de los marcadores moleculares sobre los morfológicos e isoenzimas; otras radican en su capacidad de detección de mutaciones silenciosas, que no originan cambios de aminoácidos.

Los polimorfismos detectados en el ADN se deben a **diferencias al número de determinadas regiones no codificantes** dispersas en el genoma (regiones repetidas) o a mutaciones puntuales.

En función de estas características se pueden clasificar los diferentes métodos de detección de polimorfismos:

**A- los marcadores asociados a variaciones debidas al número de repeticiones en su secuencia (microsatélites y minisatélites) y**

**B- los marcadores que detectan cambios puntuales en el genoma (RFLP, AFLP, RADP, SNP, etc.),** que pueden ser detectables o no, por enzimas de restricción.

## **A- MARCADORES ASOCIADOS A VARIACIONES DEBIDAS AL NÚMERO DE REPETICIONES EN SU SECUENCIA**

### **ADN REPETITIVO DENTRO DE UN GENOMA**

Se conoce que una gran proporción variable del genoma eucariota está compuesto por secuencias repetitivas de ADN, las cuales difieren en el número y la composición de nucleótidos.

#### **Secuencias repetitivas en tándem (se presenta un resumen en el siguiente cuadro)**

<b>ADN satélite</b>	*	ADN altamente repetitivo	
<b>Minisatélites</b>	*	<b>ADN telomérico</b>	→ Son secuencias muy conservadas. Contribuye a la estabilidad del cromosoma.
	*	<b>VNTR</b>	→ ADN moderadamente repetitivo
<b>Microsatélites</b>	*	<b>SSLP, SSR o STR</b>	→ ADN moderadamente repetitivo

## MINISATÉLITES o VNTR (número variable de repeticiones en tándem)

### (Variable Number of Tandem Repeats)

En 1980 A. R. Wyman y R. White descubrieron, por azar, la primera **región hipervariable del ADN humano**, y subsecuentemente se fueron hallando otras regiones de ese tipo cerca de los genes de la globina, la insulina, la mioglobina y otros. Estas **secuencias no codificantes e hipervariables del ADN** (de una longitud aproximada de entre 6 y 25 pb) **repetidos en tándem un número variable de veces (VNTR)**, están ubicados en regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas y forman secuencias de entre 5 y 50 kb de longitud.

Ejemplo: 7 repeticiones en tándem de la secuencia de 16 pares de bases

5'GACTGCCTGCTAAGAT**GACTGCCTGCTAAGAT**GACTGCCTGCTAAGAT**GACTGCCTGCTAAG**  
**AT**GACTGCCTGCTAAGAT**GACTGCCTGCTAAGAT**GACTGCCTGCTAAGAT

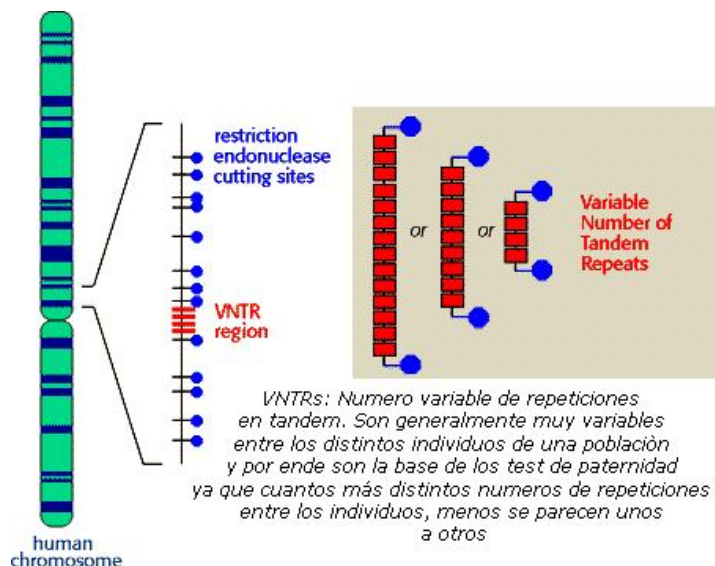


Figura 1. VNTR (número variable de repeticiones en tándem).

Se genera de este modo una gran cantidad de alelos diferenciados por el número de repeticiones que posee cada uno. Esta última característica genera un alto porcentaje de heterocigosis (generalmente mayor al 80%) alcanzado para estos loci, lo que los convierte en **marcadores altamente informativos en estudios de análisis de ligamiento y pruebas de identificación**.

En estas técnicas, los sitios de restricción de las enzimas se encuentran flanqueando las secuencias repetidas en tándem y se visualizan mediante transferencia de Southern usando secuencias VNTR como sonda observando un patrón de bandas. Las sondas moleculares desarrolladas por Jeffreys y colaboradores en el año 1985 a partir de secuencias repetitivas de un intrón de la mioglobina humana, dieron origen a la técnica conocida como **"fingerprinting de ADN"**. La misma ha revolucionado el campo de la medicina forense

y los estudios de paternidad en todo el mundo. El fingerprinting de ADN es el patrón de bandas único (huella molecular) es específico de cada individuo (excepto para los gemelos monocigóticos) obtenido por la hibridación de muestras de ADN digerido con sondas capaces de detectar múltiples minisatélites a lo largo del genoma.

Una limitación importante del análisis de huellas moleculares de ADN con VNTR es que precisa una muestra relativamente grande de ADN (100.000 células o 50µg) y el ADN debe estar relativamente intacto.

Hasta el momento, se han descrito y mapeado cientos de loci de VNTR en el genoma humano y de algunos animales, aunque se calcula que su número podría ser de varios miles por genoma.

MICROSATELITES o SSR (secuencias simples repetidas) (simple sequence repeats) o SSLP (polimorfismo de longitud de secuencias simples) (simple sequence length polymorphisms) o STR (repeticiones simples en tándem) (short tandem repeat)

Los **microsatélites**, también conocidos como **SSR, SSLP o STR**, consisten en pequeñas secuencias con **2-5 nucleótidos repetidos en tándem**, altamente variables en tamaño. Se identificaron en el año 1989 al descubrirse que existían zonas del ADN no codificante. Se llamaron primero VNTR (variable number of tandem repeats), pero luego fue reemplazada por la de microsatélite o STR (Short Tandem Repeat) para los segmentos más cortos y para los más largos la denominación VNTR o minisatélites.

En genomas eucariotas las secuencias de los microsatélites son muy frecuentes, bien distribuidas y mucho más polimórficas que los minisatélites, constituyendo la clase de marcadores moleculares más polimórficos que se conocen.

Se ha señalado que **los elementos más repetidos en mamíferos son extensiones de dinucleótidos (CA)<sub>n</sub> y (GA)<sub>n</sub>** y los más típicos constan de 10-30 copias de una repetición que usualmente no son superiores a 4 pb de longitud.

Por el momento, se desconoce exactamente el origen y la función de estas secuencias repetidas. Respecto a su origen, la aparición inicial de los microsatélites pudo deberse al azar, o podrían haber surgido como producto de mutaciones en la secuencia poli-A en el extremo 3'.

Esta fuente de mutación y cambio en el número de repeticiones podría proveer una fuente de variación cuantitativa para una rápida adaptación evolutiva de las especies a cambios ecológicos. La nutrición y el estrés podrían incrementar la velocidad de mutación en los microsatélites debido a un descenso de la regulación de reparación de errores. De esta forma, el estrés que acompaña al cambio evolutivo podría inducir en una población el incremento de mutaciones requeridas para adaptarse al cambio.

Los microsatélites han demostrado ser los marcadores más **informativos para estudios poblacionales** a nivel de subespecie. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento con este tipo de marcadores se basa en el análisis de frecuencias alélicas, con la finalidad en un principio de la creación de mapas genéticos y posteriormente para la determinación de QTLs (Quantitative Trait Loci).

Los microsatélites se encuentran en los genomas de todos los eucariotas. Por medio de la técnica de PCR se amplifican estos pequeños segmentos para el análisis de los polimorfismos utilizando un par de oligonucleótidos específicos complementarios a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite. Los fragmentos amplificados presentan un polimorfismo extensivo resultante de la diferencia en el número de elementos simples repetidos. El resultado de la amplificación se fracciona en un gel de acrilamida-urea para determinar el genotipo de cada individuo. Así, cada región microsatélite, independientemente de la secuencia repetida, constituye un locus altamente variable, multialélico y de gran contenido informativo.

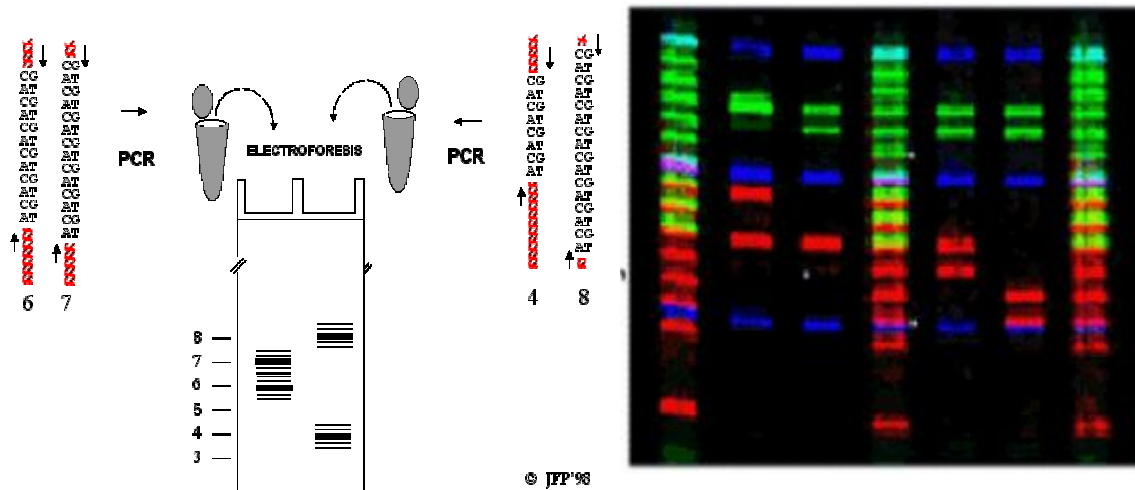


Figura 2. Detección mediante PCR de distintos alelos de un polimorfismo microsatélite y análisis de genotipos de microsatélites marcados con fluorescencia.

Los microsatélites presentan la ventaja de estar distribuidos al azar, en intrones, regiones codificantes o intergénicas; aunque con una leve tendencia a presentar una mayor densidad en la región distal (telomérica) de los cromosomas.

**El análisis de PCR se usa de manera rutinaria en casos forenses para generar perfiles de ADN a partir de muestras degradadas o antiguas.** Los microsatélites han reemplazado a los VNTR en la mayoría de los laboratorios. Es menos costoso y mucho más rápido. Los resultados de los análisis de STR se analizan e interpretan usando estadística, probabilidad y genética de poblaciones.

## B- MARCADORES QUE PRESENTAN CAMBIOS PUNTUALES EN EL GENOMA

### RFLP: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción. (Restriction Fragment Length Polimorphism)

A finales de la década del 60, el descubrimiento de las endonucleasas de bacterias (enzimas de restricción con muy alta especificidad), las cuales cortaban el ADN en secuencias definidas de usualmente 4-8 pb, conllevó al desarrollo de técnicas para el aislamiento y la manipulación de fragmentos de ADN. Una de las mayores aplicaciones de esta técnica fue el **ensamblaje de los mapas genéticos con el polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción**.

Esta técnica explota las **variaciones en las secuencias del ADN** por la creación o abolición de sitios para el corte de las endonucleasas, dadas por los **cambios de bases, las adiciones o deleciones de fragmentos de ADN** entre y en estos sitios. Además, algunas endonucleasas son incapaces de cortar el ADN si la secuencia de reconocimiento contiene uno o más sitios de citosina metilada, **por lo tanto tales enzimas pueden detectar polimorfismo si hay variaciones en los patrones de metilación**.

El estudio de los polimorfismos de este tipo consiste en el **análisis en cuanto a número y tamaño de los fragmentos de ADN que se originan** al digerir con las mencionadas enzimas el material genómico o un fragmento amplificado del genoma, de manera que un sitio de restricción polimórfico o una deleción o inserción entre dos sitios de corte será detectado como un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción generados a nivel fenotípico. La técnica consta de las siguientes etapas (figura 3): **digestión del ADN** con enzimas de restricción; **separación por electroforesis de los fragmentos** resultantes; **transferencia de los fragmentos separados a membranas de nitrocelulosa** (Southern Blotting) e **hibridación con sondas moleculares radiactivas** y exposición de la membrana a un filme de rayos X. La identificación del polimorfismo también puede hacerse por PCR. Este método se ha empleado en la caracterización de los genes de algunas de las proteínas lácteas bovinas.

El uso de los **RFLP** como marcadores para trazar la transmisión de los genes asociados a ellos, es de una utilidad considerable en genética pues tienen como ventajas el **no estar influenciados por el ambiente, no depender del estado ontogénico del animal, permitir un análisis de todo el genoma**, poder ser **detectados en estadios muy tempranos del desarrollo** independientemente de la expresión del gen, una vez heredados, y además poseen la característica de ser **codominantes** en la expresión fenotípica, es decir, permiten discernir entre el individuo homocigótico dominante y el heterocigótico; son muy comunes y cualquier gen debe tener sitios de restricción polimórficos en una vecindad de varios cientos de pares de bases.

Pero tienen como desventajas que son **muy costosos, necesitan de un personal calificado y entrenado** para trabajarlo, precisan el **uso de radioactividad** y además, consumen mucho tiempo. En animales domésticos se ha realizado este tipo de análisis del ADN desde 1985, con numerosos trabajos en una amplia diversidad de especies.

Otras de las aplicaciones de esta tecnología ha sido el desarrollo de detallados mapas de ligamiento en una amplia variedad de organismos. Aunque ésta es la más conocida, el RFLP se ha empleado también en la caracterización del genoma de organelos, en la identificación de líneas o individuos y en las investigaciones sobre el tema de la diversidad genética. La identificación y el mapeo de RFLP han revolucionado la genética humana por el desarrollo del diagnóstico asistido por marcadores y la detección de una amplia variedad de enfermedades hereditarias. A pesar de haber sido ignorados este tipo de marcadores en sus inicios por los genetistas veterinarios, los mismos métodos para el mapeo en humanos son empleados para estudios de diferentes especies animales, respecto a los sitios polimórficos, produciéndose una revolución en el mejoramiento animal por la introducción de la selección asistida por marcadores (Marker Asisted Selection: MAS).

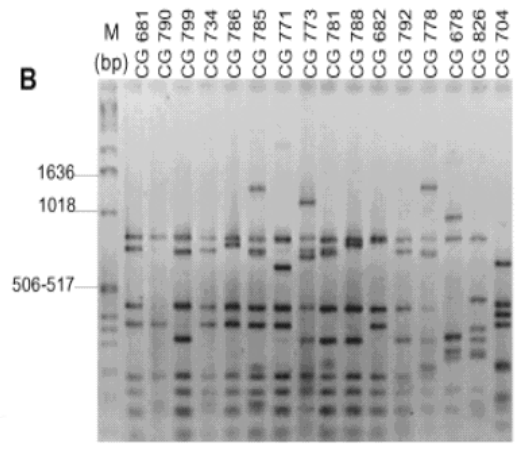
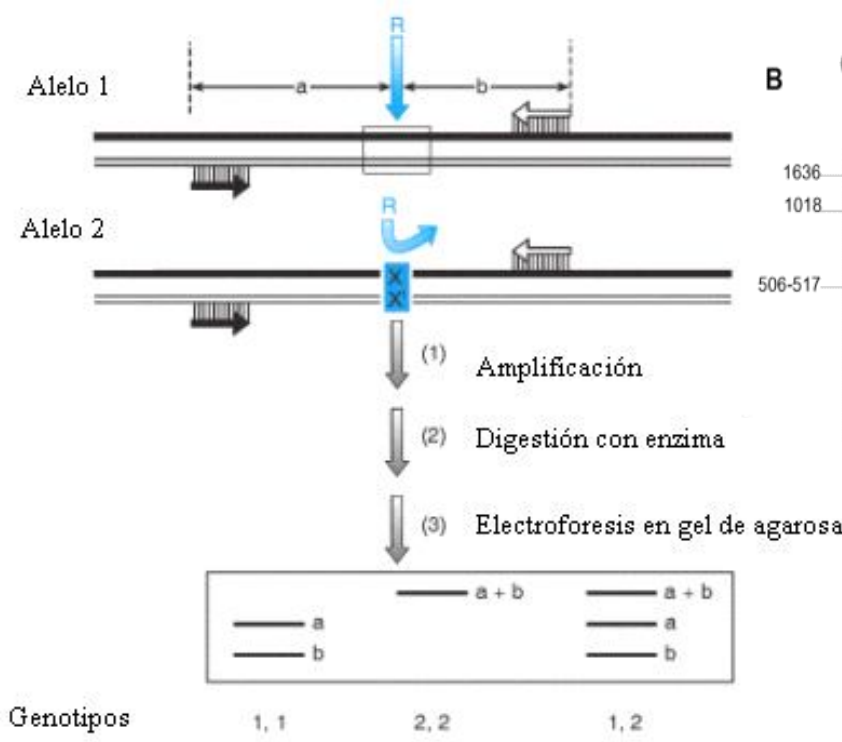


Figura 3. A: Representación esquemática del principio genético del RFLP. B: Gel de azarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio conteniendo los productos obtenidos de ADN de diferentes individuos, amplificados por PCR

**RAPD: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplified Polymorphic DNA)**

La técnica RAPD, conocida también como AP-PCR es básicamente una variación del protocolo de la PCR con dos características distintivas: **utiliza un cebador único** (en lugar de un par de primers) **con una secuencia arbitraria, por lo tanto desconocida. Para que**



ocurra la **amplificación**, dos secuencias complementarias al cebador arbitrario deben estar lo suficientemente adyacentes (~400pb) y en orientación opuesta que permita la amplificación exponencial por la ADN-polimerasa (Figura 4).

En los RAPD se emplean **cebadores cortos** (10 pares de bases) que se utilizan de forma individual en reacciones de PCR con un nivel de especificación muy bajos. De esta manera se genera un patrón de bandas sencillos que dependerá de la capacidad de los cebadores para encontrar zonas en el ADN, parcial o totalmente complementario.

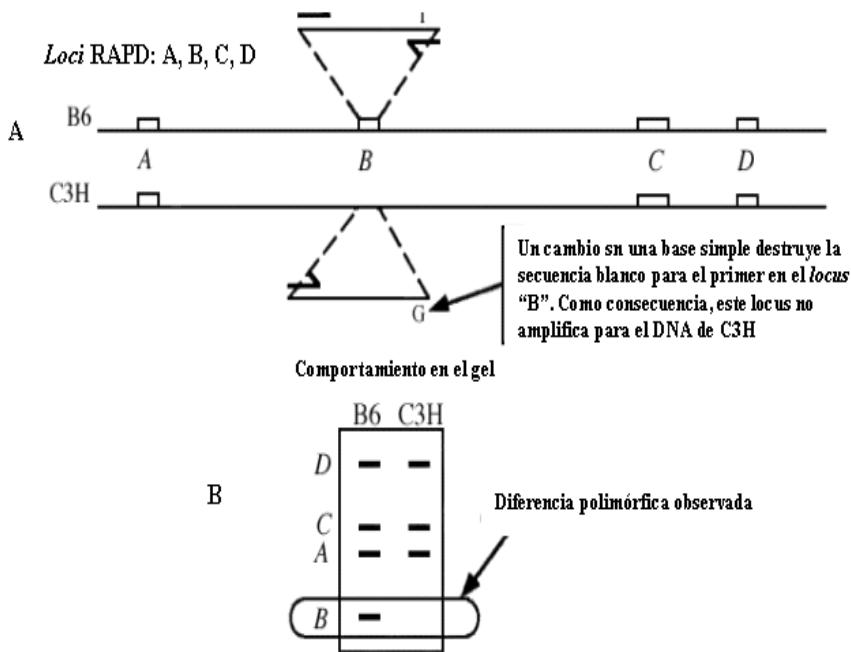


Figura 4. Detección de un loci polimórfico a través de la técnica RAPD. (las líneas horizontales representan los cromosomas de las líneas consanguíneas de ratones C3Hy B6)

Durante la fase de alineamiento de la reacción de PCR-RAPD, el cebador o primer arbitrario se unirá a los sitios de la secuencia complementaria en el ADN molde desnaturizado. Si dos moléculas se alinean con el molde en cadenas opuestas, con la orientación apropiada y con una distancia amplificable (menor o igual a 2500 bases) entonces será amplificado un fragmento discreto de ADN. Cada primer es potencialmente capaz de amplificar un número de fragmentos (1-10 o más) de diferentes loci durante la misma reacción de PCR resultando en varias bandas. **Los segmentos amplificados pueden ser visualizados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio o en geles de poliacrilamida de alta resolución visualizados por autorradiografía o teñidos con plata detectándose el polimorfismo como ausencia o presencia de bandas de un fragmento particular.**

Los polimorfismos RAPD resultan de la diferencia de secuencias en uno o ambos sitios de unión de los primers, los cuales evitan el alineamiento de la secuencia molde. Otras fuentes de polimorfismo RAPD pueden incluir diferencias de apenas un par de bases (mutaciones puntuales) que son suficientes para causar complementariedad del primer en el sitio de iniciación; deleciones o inserciones adyacentes en el sitio de iniciación de modo

que provoquen la acción de la ADN-polimerasa, por lo que los marcadores RAPD tienen naturaleza binaria, el segmento amplificado está presente o no; **son marcadores dominantes** porque solo se amplifica una variante alélica, aquella que cumple con los requisitos de complementariedad entre el cebador y las cadenas de ADN a una distancia menor o igual a 2Kb.

La distribución de marcadores RAPD a lo largo del genoma es una consideración importante cuando se evalúa la utilidad de estos marcadores, los cuales están **ampliamente ubicados más o menos al azar por todo el genoma**. Existen reportes que verifican su presencia en el genoma de numerosas especies. Los RAPDs se han utilizado también para la caracterización racial en ganado bovino.

Una característica importante en cualquier marcador genético es que posean una reproducibilidad consistente.

**Para esta técnica no es necesario conocer previamente la secuencia del ADN.**

Esta técnica se diferencia fundamentalmente de otras y muestra ventajas, por ejemplo, sobre RFLP, en que **no se basa en hibridación sino en la amplificación de ADN**, lo que implica simplicidad y rapidez, lo cual se

En este tipo de marcadores factores como calidad y concentración del ADN molde, presencia de contaminantes precipitables con etanol, concentración de cloruro de magnesio, contenido de G+C en los primers y su concentración y la eficiencia del termociclador, influyen en la amplificación y afectan la sensibilidad de la reacción, además de la fuente de la ADN polimerasa.

debe a la posibilidad de detectar polimorfismo por la visualización directa de las bandas en el gel, eliminando todas las etapas de transferencia de ADN para membranas (Southern Blot), hibridación con sondas específicas y autorradiografía; no requiere del desarrollo de una librería de sondas específicas, sino que un conjunto de primers arbitrarios puede utilizarse para cualquier organismo; se elimina la necesidad de isótopos radiactivos, se requiere 10-3 veces menos concentración de ADN que para RFLP y la principal **desventaja es el bajo contenido de información genética por loci asociado a la dominancia** de los marcadores RAPD, además de que para su desarrollo requiere que se garanticen condiciones de adecuada repetibilidad, además de ser un **método muy trabajoso y costoso**.

### [AFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados \(Amplified fragment length polymorphisms\)](#)

**Se basa en la amplificación arbitraria de fragmentos de restricción de ADN ligados a adaptadores:** se utilizan cebadores **semiespecíficos con secuencia complementaria al adaptador en el extremo 5´**. Estos marcadores combinan dos enzimas de restricción, (generalmente la *EcoR1* y la *Mse1*) y dos amplificaciones de PCR usando primers marcados. Se generan patrones de bandas complejos en donde es fácil encontrar polimorfismos

claramente diferenciales. Consiste en la amplificación de múltiples regiones arbitrarias del genoma.

Involucra cuatro etapas:

- **digestión con dos enzimas de restricción**, una de corte raro (reconoce secuencias de 6pb) y otra de corte frecuente (reconoce secuencias de 4pb);
- **acoplamiento de adaptadores específicos** de doble cadena a los extremos de los fragmentos de restricción;
- **amplificación selectiva de fragmentos** con cebadores específicos. Se lleva a cabo con el uso de iniciadores que contienen una base extra en el extremo 3' lo que produce un conjunto de fragmentos que además de llevar la secuencia complementaria al primer o iniciador, complementan a la base extra adicional. Hay **una segunda amplificación** en la cual se conocen iniciadores con dos o tres bases extras. Los fragmentos son complementarios a las extensiones consideradas.
- **separación de los fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida.**

Se pueden utilizar varios métodos para revelar el patrón de bandas: empleo de **isótopos radiactivos y la tinción con nitrato de plata.**

Mediante la selección del número de nucleótidos selectivos es posible controlar el número de fragmentos a amplificar, en una relación inversamente proporcional. **El polimorfismo es detectado por la presencia o ausencia de bandas** debido a mutaciones en los sitios de restricción o en secuencias adyacentes a estos, los cuales se complementan o se diferencian de los nucleótidos selectivos añadidos a los cebadores de la PCR, y por inserciones o deleciones dentro del fragmento amplificado.

Tiene como ventajas que se obtiene un **alto grado de polimorfismo, un mayor número de marcadores por gel analizado y no requiere del conocimiento de la secuencia de ADN.** Debido a la cantidad de marcadores que pueden ser generados, el mapeo genético puede realizarse con mayor rapidez y más fácilmente. Es una técnica para estudios de biodiversidad. Comparado con RFLP es **más rápido, menos laborioso y provee mayor información.** Revela fundamentalmente el polimorfismo **dominante**, que puede ser por la presencia o ausencia del sitio de restricción o por una simple variación de un nucleótido en el genoma.

Los marcadores AFLP pueden ser aislados del gel y usarlo como sondas para caracterizar nuevos clones, o secuenciarlos para diseñar cebadores y emplearlos en otras técnicas basadas en PCR.

El ADN genómico es digerido con una enzima de corte raro y otra de corte frecuente (*Mse* I y *Eco*RI)



Se generan tres tipos de fragmentos de restricción: uno con cortes para *Eco*RI en ambos extremos, otro con un final *ecor* I y otro *Mse* I y un tercero con *Mse* I en ambos extremos

Adaptador *Eco*RI

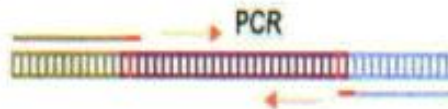


Adaptadores específicos para sitios de restricción se "ligan" a los fragmentos generados



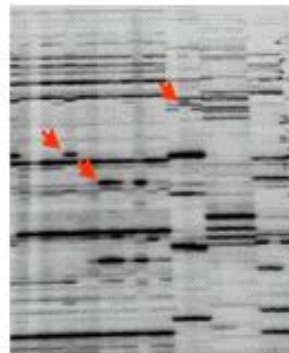
**Pre-amplificación selectiva:** Se incrementa 16 veces la reducción de la complejidad de los productos restricción-ligación

Cebadores selectivos +1  
Adaptador *Eco*RI + base A  
Adaptador *Mse* I + base C



Amplificación selectiva: reduce la complejidad de la mezcla e productos de PCR. 256 veces

Adaptador *Eco*RI + bases AC  
Adaptador *Mse* I + bases CA  
Cebadores selectivos +2



Ambos productos se corren en un gel desnaturalizante de poliacrilamida y se visualiza por tinción con plata

Figura 5. Representación esquemática de los AFLP

### SSCPs: Polimorfismo de Conformación de las Cadenas Simples

El ADN de cadena simple tiende a doblarse y formar estructuras complejas estabilizadas por enlaces intramoleculares débiles, especialmente por puentes de hidrógeno. **Consiste en la detección de las diferencias entre fragmentos de ADN amplificados**, con distinta secuencia. Esto permite la detección de mutaciones puntuales de ADN sin necesidad de conocer su secuencia y son capaces de identificar entre el 30 y 70% de todos los polimorfismos debidos a una mutación simple. Su detección se lleva a cabo en un gel de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Los primers pueden estar radioactivamente marcados, o puede realizarse la detección de los productos amplificados por tinción con plata y siempre deben incluirse muestras controles para identificar el tipo salvaje del mutado.

SSCP es simple y adecuadamente sensible para fragmentos de hasta 200pb de longitud, y han sido utilizados en la identificación de variantes alélicas de las proteínas lácteas, pero para el desarrollo de esta metodología se requiere una amplia batería de oligonucleótidos que encarece su utilización.

### SNPs: Polimorfismo de nucleótido simple (Single Nucleotide Polymorphism)

Se consideran la más reciente generación de marcadores moleculares, **basados en la identificación de la sustitución de un nucleótido por otro**, representando solamente dos alelos simples. **Su frecuencia oscila entre 1 cada 600 y 1 cada 1000 pares de bases**. Ellos incluyen la técnica clásica de RFLPs pero no exactamente detectando la aparición o abolición de un sitio de restricción. Constituye una ventaja el hecho de que puedan ser detectados sobre "arrays" (chips) de fase sólida sin necesidad del empleo de electroforesis en geles.

El método más directo para la detección es la secuenciación de segmentos de ADN, previamente amplificados por PCR, de varios individuos que representen la diversidad de la población. Se diseñan cebadores para amplificar fragmentos de ADN de 400-700 pb, derivados fundamentalmente de genes de interés o de secuencias reportadas en bases de datos correspondientes a secuencias expresadas (expressed sequence tag, EST). Los productos amplificados se secuencian en ambas direcciones y sus secuencias se comparan en busca de polimorfismos.

**El microarray es un arreglo de cientos a millares de secuencias de ADN inmovilizadas y ordenadas en forma de matriz adheridas a una superficie sólida (generalmente de cristal). Cada secuencia es un gen diferente.**

La mayoría de los métodos de detección de SNPs se basan en la amplificación usando "multiplex" de una secuencia diana y la hibridación con oligonucleótidos anclados al "microarray", cada uno de los cuales está terminado en un nucleótido polimórfico.

Un paso sencillo de extensión del primer se lleva a cabo sobre el "array", usando una mezcla de cuatro dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia. Las marcas se adicionan a los cebadores que se unen perfectamente al ADN, no siendo así con aquellos que no lo hacen en el extremo 3'. La lectura de la presencia o ausencia de fluorescencia en el "array" permite obtener el tipo de cada SNP sobre el "array".

Cualquiera de los cuatro nucleótidos puede estar presente en cualquier posición en el genoma, por lo tanto se debe suponer que cada SNP tendría cuatro alelos. Teóricamente esto es posible, pero en la práctica la mayoría de los SNP tienen solamente dos variantes, la secuencia original y la versión mutada. Esto se debe a la vía en que estos aparecen y se distribuyen en una población. Un SNP se origina cuando una mutación puntual ocurre en el

genoma, convirtiendo un nucleótido en otro. Si la mutación ocurre en las células reproductivas de un individuo, pudiendo ser heredada por uno o más descendientes y después de muchas generaciones, el SNP puede establecerse en la población. Para que se produzca un tercer alelo, una nueva mutación debe ocurrir en la misma posición en el genoma de otro individuo, y este individuo y su descendencia deben reproducirse de forma tal que el nuevo alelo quede establecido. Esto no es imposible, pero es poco probable, por lo tanto la mayoría de los SNP son bialélicos.

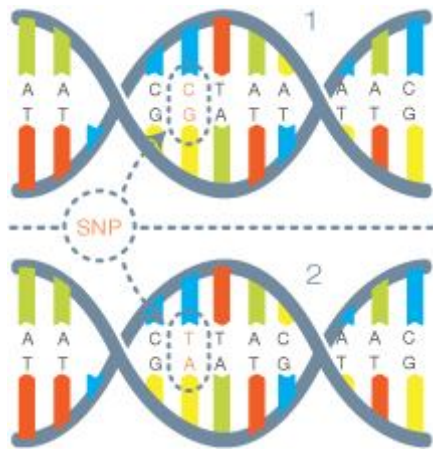


Figura 6. Los SNP son marcadores basados en la identificación de la sustitución de un nucleótido por otro.

Los SNP pueden aparecer tanto fuera de los genes (que no afectan la producción o función de alguna proteína) como en un gen específico, donde pueden ubicarse en regiones codificantes (relacionados con cambios en la cantidad de proteína producidas) o no codificantes (que afectan solo la secuencia de aminoácidos).

Estos han sido empleados como marcadores para el diagnóstico de rasgos específicos por ser abundantes en el genoma bovino, genéticamente estables y de análisis fácilmente automatizable, lo que ha permitido además, su utilización como marcadores para la identificación animal y pruebas de paternidad en ganado bovino.



Fig. 19-15 Genetics, Second Edition © 2005 W.H. Freeman and Company

Un **haplotipo** es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos, están ligados en un mismo cromosoma. Un haplotipo puede ser un locus, varios loci, o un cromosoma entero dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado de loci.

Figura 7. Un haplotipo es un conjunto específico de SNP y otras variantes genéticas observadas en un cromosoma individual o en parte de un cromosoma.

Dada la alta variabilidad alélica, la probabilidad de que dos individuos no relacionados presenten un mismo haplotipo, es prácticamente nula. Es por esto que el estudio de haplotipos se ha convertido en una herramienta útil en la determinación de relaciones genéticas entre individuos. Los SNPs (polimorfismos de nucleótido simple) se heredan en grupos que se encuentran estrechamente relacionados en el ADN. A este grupo de SNPs que se heredan en bloque, es a lo que hemos denominado haplotipos.

## EST: Etiquetas de secuencia expresada (Expressed sequence tags)

Los EST **son secuencias cortas obtenidas de clones de ADN complementario (ADNc)** y sirven como pequeños identificadores del gen. Puede usarse como un marcador, para buscar el resto del gen o para ubicarlo en un segmento más grande de ADN.

Típicamente tienen entre 200 y 400 nucleótidos de longitud. Los datos de los EST son capaces de proporcionar una estimación aproximada de los genes que están expresados activamente en un genoma bajo una condición fisiológica en particular.

Esto debido a que las frecuencias para EST's particulares reflejan abundancia en los ARNm de una célula, que corresponde con los niveles de expresión de genes bajo esa condición. Otro potencial beneficio del muestreo por EST es que, al secuenciar clones de ADNc de manera aleatoria es posible encontrar nuevos genes. Sin embargo la utilización de EST también presenta varios inconvenientes, para el análisis de perfiles de expresión. Tienen como desventaja:

- Baja calidad, debido a que se generan de forma automatizada, sin verificación (conlleva a altos índices de error)
- Errores de lectura
- Contaminación común por vectores de secuencia, intrones (de ARN no empalmado), ARN ribosomal, ARN mitocondrial entre otros.

A pesar de estas limitaciones, la tecnología EST es todavía ampliamente utilizada, debido a que las bibliotecas de EST pueden ser generadas fácilmente de diferentes tipos de células (tejidos, órganos). Además facilita la identificación exclusiva de un gen de una biblioteca de ADNc. Aunque los EST son propensos a errores, una colección completa de EST contiene información muy útil.

La rápida acumulación de secuencias de EST, ha impulsado el establecimiento de bases de datos públicas y privadas para almacenar los datos. **Genbank tiene una base de datos EST, dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbEST/>).**

Uno de los objetivos de las bases de datos de EST es organizar y consolidar un gran número redundante de datos para mejorar la calidad de la información.

Este proceso incluye el preprocesamiento de los datos el cual remueve vectores contaminantes y enmascara repeticiones. Después sigue un proceso de agrupamiento o clustering que agrupa secuencias EST asociadas a genes únicos.

El siguiente paso es obtener el consenso mediante la fusión de secuencias redundantes, superposición de EST y errores de lectura.

Una vez que la secuencia de codificación es identificada puede ser anotada traduciéndola a una secuencia de proteínas para búsqueda de similitudes en base de datos.

El compilado de EST puede ser utilizado para alinearlo con la secuencia del genoma y así poder identificar la localización del gen expresado y así como también obtener los límites entre exones e intrones.

El proceso de agrupamiento que reduce la redundancia de EST y produce una colección de secuencias EST de genes no redundantes se conoce como construcción de índices de genes.

### STS: sitio de secuencia de etiquetado (Sequence tagged sites)

A diferencia de la PCR con cebadores arbitrarios (RADP y AFLP), el diseño de los cebadores para detectar sitios de secuencia etiquetada (STS) está basado en cierto conocimiento de las secuencias. Estos cebadores son **únicos y específicos** de las secuencias, y detectan variación en el ADN genómico. Los STS tienen una ventaja especial sobre los RAPD por ser **codominantes**, o sea, pueden distinguir entre los homocigotos y los heterocigotos. Tienden también a ser más reproducibles, porque las secuencias de los cebadores son más largas.

Tienen, sin embargo, una desventaja: requieren de algún conocimiento preexistente de la secuencia del ADN de la región, aunque sólo sea parcial. Su inconveniente principal es la inversión en esfuerzo y costo que se necesita para diseñar los cebadores específicos de cada locus.

Del mismo modo que con los RAPD, el uso de la PCR genera datos rápidamente y requiere poco ADN. Todos los métodos de STS usan los mismos protocolos básicos que usan los RAPD (extracción de ADN y PCR) y requieren el mismo equipo.

Aprovecha las secuencias conocidas, únicas dentro del genoma, para amplificarlas por PCR. El polimorfismo se suele encontrar fácilmente cuando lo que se amplifican son intrones en lugar de exones. La ventaja principal es la velocidad con la que se pueden realizar los análisis una vez que las parejas de oligonucleótidos se han establecido claramente. Por tanto se combinan la rapidez de la RAPD con la especificidad de la RFLP.



**Tabla 1: Comparación de algunos marcadores genéticos**

Característica	RFLP	SSR	RAPD	AFLP	Isoenzimas	STS / EST
<b>Origen</b>	Anónimo / génica	Anónimo	Anónimo	Anónimo	Génica	Génica
<b>El número máximo teórico de posibles loci en el análisis</b>	Limitado por el sitio de restricción (nucleótidos) polimorfismo (decenas de miles)	Limitado por el tamaño del genoma y el número de repeticiones simples en un genoma (decenas de miles)	Limitado por el tamaño del genoma, y por el polimorfismo de nucleótido (decenas de miles)	Limitado por el sitio de restricción (nucleótidos) polimorfismo (decenas de miles)	Limitado por el número de genes de enzimas y ensayos histoquímicos enzimáticos disponibles (30-50)	Limitado por el número de genes expresados (10.000-30.000)
<b>Dominio</b>	Codominante	Codominante	Dominante	Dominante	Codominante	Codominante
<b>Alelos nulos</b>	Raro muy raro	Ocasional a frecuente	No aplicable (presencia / ausencia tipo de detección)	No aplicable (presencia / ausencia tipo de detección)	Raro	Raro
<b>Transferibilidad</b>	A través de géneros	Dentro de los géneros o especies	Dentro de las especies	Dentro de las especies	A través de las familias y géneros	A través de las especies relacionadas
<b>Reproducibilidad</b>	Alto a muy alto	De medio a alto	Bajo a medio	De medio a alto	Muy alto	Alto
<b>Cantidad de muestra requerida por muestra</b>	2.10 mg de ADN	10-20 ng de DNA	2-10 ng de DNA	0.2-1 g de ADN	Varios mg de tejido	10-20 ng de DNA
<b>Facilidad de desarrollo</b>	Difícil	Difícil	Fácil	Moderado	Moderado	Moderado
<b>Facilidad de ensayo</b>	Difícil	Fácil a moderado	Fácil a moderado	De moderada a difícil	Fácil a moderado	Fácil a moderado
<b>Automatización / multiplex</b>	Difícil	Posible	Posible	Posible	Difícil	Posible
<b>Genoma y el potencial de mapeo de QTL</b>	Bueno	Bueno	Muy bueno	Muy bueno	Limitado	Bueno
<b>Potencial de mapeo comparativo</b>	Bueno	Limitado	Muy limitada	Muy limitada	Excelente	Buena a muy buena
<b>Mapeo de genes candidatos potenciales</b>	Limitado	Inútil	Inútil	Inútil	Limitado	Excelente
<b>Potencial para el estudio de la variación genética adaptativa</b>	Limitado	Limitado	Limitado	Limitado	Bueno	Excelente
<b>Desarrollo</b>	Moderado	Caro	Barato	Moderado	Barato	Caro
<b>Ensayo</b>	Moderado	Moderado	Barato	Moderado a cara	Barato	Moderado
<b>Equipo</b>	Moderado	Moderado a cara	Moderado	Moderado a cara	Barato	Moderado a cara

RFLP – polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción; SSR - repeticiones de secuencia simple (microsatélites); RAPD – amplificación al azar de ADN polimórfico; AFLP - polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados; STS - sitio de secuencia de etiquetado; EST - etiquetas de secuencias expresadas.

Fuente: <http://www.fao.org>

## CRITERIOS PARA SELECCIONAR EL TIPO DE TÉCNICA

La selección de la técnica depende del objetivo trazado. **Las técnicas moleculares brindan información a diferentes niveles taxonómicos. Todas tienen sus limitaciones y su aplicación estará determinada en gran medida, por la información que estamos buscando** con la utilización de un sistema de marcadores moleculares, así como la disponibilidad de recursos necesarios para el desarrollo de este tipo de técnicas. Entre los factores más importantes a considerar se encuentran el contenido de información y el radio múltiple que cada técnica puede brindar. El contenido de información refleja el número de alelos que pueden ser detectados por el marcador en un número e individuos. El radio múltiple lo constituyen el número de marcadores que pueden ser generados por una reacción simple

**La selección del método depende de la aplicación específica que se desea.** Si el objetivo es identificar el genoma o evaluar la diversidad genética, los métodos con radio múltiple (ej. AFLP), son apropiados debido a que pueden ser detectados muchos loci distribuidos al azar por el genoma. Este tipo de marcadores también son muy útiles en análisis genotípicos y taxonómicos para construir mapas genéticos y para identificar marcadores unidos a un carácter en particular. Para varios aspectos de la biología poblacional (análisis de paternidad, flujo de genes, etc.) y mejoramiento genético, los métodos con alto contenido de información son más útiles.

## ALGUNAS APLICACIONES DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN GANADERÍA



Los marcadores moleculares se aplican en diferentes campos de investigación, y se utilizan en el aislamiento de genes con función desconocida, gracias al conocimiento de su posición en el genoma y en el campo de la evolución, mediante la comparación de mapas genéticos para la ubicación de las alteraciones estructurales del genoma que ocurren durante la diversificación de un género o familia. Sin embargo, el campo más favorecido por los marcadores moleculares es la genética cuantitativa, y es muy utilizada por los criadores. La genética cuantitativa incluye el análisis de las bases genéticas de la variación morfológica, el desarrollo de estrategias para la caracterización de genes que se puedan "cuantificar" (**QTL**); la **selección asistida por marcadores (SAM)**, en el caso de características influenciadas por varios genes, ó poligénicas; y la **selección asistida por genes (SAG)**, en el caso de características influenciadas por un solo gen, ó monogénicas. La SAM y la SAG son dos herramientas poderosas en el mejoramiento de plantas y animales. Los marcadores genéticos tienen muchas aplicaciones en diferentes fases de programas de selección: la optimización para la conservación de fuentes de genes, selección de padres, identificación de alelos favorables y desarrollo de genotipos que acumulen tales alelos. Cualquier contribución de los marcadores moleculares a la selección, se basa en la disponibilidad de marcadores ligados a aquellos genes involucrados en la variación de la característica seleccionada. Así, la aplicación de la SAM y SAG se puede utilizar para el desarrollo de genotipos particulares y para el mejoramiento de poblaciones por selección recurrente.

Los marcadores constituyen una herramienta fundamental en la construcción de **mapas genéticos**. Dichos mapas, además de su indudable interés científico, son herramientas fundamentales para la identificación y aislamiento tanto de genes responsables de enfermedades como otros de interés económico para posteriormente utilizar esta información en programas de mejoramiento animal a través de la llamada Selección Asistida por Marcadores. También ofrecen considerables posibilidades para **mejorar la elaboración de productos agroindustriales**, sobre todo mediante procesos inocuos para el medio ambiente y de elevado rendimiento energético. Aunque probablemente la mayor parte de estas tecnologías no estarán al alcance de la producción pecuaria tradicional, resultarán considerablemente accesibles para el sector comercial e industrial emergente de muchos países en desarrollo.

La **identificación de parentesco o control de filiación** se lleva a cabo también por el uso de paneles de microsatélites. La existencia de animales clonados llevó a un profundo análisis en el país sobre los requisitos para la inscripción de los mismos en registros genealógicos, ya que por definición no tienen progenitores. Es así que la confirmación formal de la identidad de un clon en relación al animal que le dio origen, debe hacerse obligatoriamente a través de un panel de marcadores genéticos moleculares.

El impacto de los errores tiene sobre los programas de mejora un alto impacto dado que permite un correcto registro genealógico. La identificación de los mismos ha permitido

la determinación del genotipo actual en un locus o loci específico sin errores debidos a los efectos ambientales. En vacunos, cerdos y caballos principalmente, el control de parentesco se ha realizado de forma rutinaria en la mayoría de los países mediante la metodología de grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos.

El Laboratorio de Genética Aplicada de la Sociedad Rural Argentina (<http://www.sra.org.ar/laboratorio>) cumple con los requisitos de confirmación de parentesco y la inscripción de reproductores en los registros genealógicos. Hasta el 2010 se habían realizado más de 56.000 análisis en bovinos y 75.000 en equinos.

Esta aplicación tiene un gran impacto en la implementación de planes de mejoramiento. La falta de genealogía impide la implementación de los métodos basados en genética cuantitativa, porque es imprescindible establecer las relaciones de parentesco en la población. Estos métodos requieren la definición de una matriz de parentesco entre los animales evaluados. El caso más simple es el de los servicios a campo con varios toros. En estos casos, dado el limitado uso de la inseminación artificial en bovinos para carne, restringe severamente la evaluación genética. Si bien la relación costo/beneficio no es todavía muy favorable, la tecnología está disponible, es efectiva y potenciaría significativamente la utilidad de las metodologías de la genética cuantitativa.

La identificación genética permite hablar de una **huella genética**. En este sentido se pueden identificar genotipos en loci cuyos genes tienen efectos directos sobre una característica particular. Esta aplicación permite llevar adelante análisis de **trazabilidad**.

Respecto a la seguridad alimentaria se han puesto de relieve la necesidad de métodos más eficaces para el rastreo de animales vivos y sus derivados, especialmente cuando son objeto de intercambios comerciales. La trazabilidad se define como la **posibilidad de encontrar o seguir el rastro a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución de un animal, alimento o sustancia**. No debe confundirse la trazabilidad con la identificación de un individuo, una correcta trazabilidad comprende a una correcta identificación previa. Por otro lado, la respuesta biológica de los individuos en un ambiente dado se establece gracias a uno o un grupo de genes que son los responsables de que un animal sea inferior o superior en cuanto a producción se refiere; que manifieste un color u otro, un incremento en la masa muscular, un incremento en la producción de leche o un incremento en la prolificidad.

Los marcadores también permiten la **identificación racial**. Por ejemplo, los productos del cerdo ibérico presentan un elevado valor económico siendo importante detectar su origen para verificar la relación entre el producto etiquetado y su origen genético. En el caso del cerdo el gen MC1R que codifica para el receptor de la melancortina (relacionado con la pigmentación de la capa) presenta 4 alelos conocidos. El cerdo ibérico presenta los alelos MC1R\*1 y el MCR1\*3, mientras que el MCR1\*4 es responsable de la capa colorada del Duroc. La denominación de origen de estos productos se realiza mediante el genotipado.

De una manera más específica también se puede realizar la **identificación de especies** para asegurar un correcto etiquetado y la procedencia de las materias primas por ejemplo en una cadena alimentaria. Por ejemplo en embutidos o pates etc. y cuyo precio también varía de acuerdo de su elaboración. Existen marcadores de tipo RAPD para diferencias entre las especies como pollo, pavo, cerdo etc.

En especies de rumiantes existe necesidad de identificar el origen de la leche con la que se han elaborado ciertos productos. No cotiza de la misma manera un queso de oveja que de vaca. Se han amplificado regiones del citocromo b para obtener patrones de diferentes especies.

**Detección de la introgresión genética.** Con este término se entiende la inclusión de genes en una población de otra diferente. El problema es detectar la presencia de genomas foráneos en el genomio de una especie autóctona que por ejemplo va a ser liberada en la naturaleza. Estas actuaciones afectan a la integridad genética de las especies autóctonas dando lugar a un deterioro genético de la biodiversidad.

Los marcadores constituyen una buena herramienta para **analizar la diversidad genética** como control de las poblaciones, introducción de genotipos, límites a la selección y medidas de la pérdida de variabilidad genética.

**Detección de portadores.** En la actualidad se cuenta con marcadores genéticos confiables que son útiles para la genotipificación y la detección de los individuos que son portadores de genes para producción, con predisposición para desarrollar enfermedades, o genes que confieren resistencia a ciertas enfermedades. Al identificar a los individuos poseedores de estos marcadores se pueden comenzar a diseñar cruzamientos, sistemas de mejora genética o planear la producción con objetivos de producción bien definidos.

En el siguiente cuadro se citan algunos marcadores que se pueden utilizar para genotipificar individuos de las especies animales de interés pecuario. Se citan marcadores, genes o QTL que están disponibles a nivel comercial para identificar a aquellos individuos bovinos, porcinos u ovinos portadores de rasgos productivos deseables (miostatina en bovino, gen boorola en ovino) o indeseables (por ejemplo, la rianodina, el gen de hipertermia maligna en cerdo y el gen del síndrome de patas de araña en ovino). Una vez obtenida esta información genética, la misma se puede aplicar para llevar a cabo programas de cruzamiento o de mejora genética, para mejorar la productividad animal, para elevar la calidad de los productos que derivan de los animales domésticos, para establecer denominaciones de origen de productos pecuarios o para eliminar los animales portadores de genes indeseables.

**Tabla 2: Marcadores utilizados a escala comercial para ser tomados en cuenta en la selección de individuos asistida por marcadores-genes.**

Especie	Locus/Gen/QTL	Nombre/Función	Característica(s) afectada(s)
Bovino	DGAT1	Diacylglicerol acetiltransferasa	Composición de la leche
	CAPNI	$\mu$ -Calpaina	Termeza de la carne
	CAST	Calpastatina	Termeza de la carne
	LEP	Leptina	Engrasamiento de la canal
	TG	Tiroglobulina	Engrasamiento intramuscular
	MSTN	Miostatina	Doble musculatura
	IFNG	Interferón gama	Resistencia a nemátodos
GHR	Receptor de la hormona del crecimiento	Peso al destete y canal	
Porcino	HAL/ROR1	Receptor de rianodina o hipertermia maligna	Rendimiento en canal PSE
	CAST	Calpastatina	Termeza de la carne
	HFABP	Proteína cardiaca de ligamiento de ácidos grasos	Grasa intramuscular
	ESR	Receptor de estrógenos	Tamaño de camada
	PRLR	Receptor de prolactina	Tamaño de camada
	SLA	Antígeno leucocitario porcino	Grasa dorsal, área del lomo, calidad de carne
	ACT1 ACT2	$\alpha$ -actina $\gamma$ -actina	Fertilidad del berraco Calidad espermática
Ovino	PRNP	Proteína prión	Resistencia/susceptibilidad de scrapie
	CLPG	Gen Callipyge (nalgón, culón)	Producción de músculo/carne
	BOF	Gen Boroola	Fecundidad/prolificidad
	FGFR3	Síndrome de patas de araña	Anormalidad esquelética
	IFNG	Interferón gama	Resistencia a nemátodos

Adaptado con datos de Cokett et al., 1999; Switowski, 2002; Casas et al., 2003; Tupac-Yupanqui et al., 2004; Charon, 2005; Whimmers et al., 2005; Casas 2006.

En la actualidad existe lo que se denomina **prueba genética**, la cual consiste de varios métodos de prueba para estudiar el ADN de ciertas especies domésticas. Algunas de estas pruebas ayudan a identificar individuos portadores de marcadores que permitirían su selección o eliminación. Entre ella se encuentran la prueba de halotano (HAL) para el estrés que repercute en la calidad de carne en cerdos, la prueba de hipertermia maligna en cerdos (HTM), la prueba de tamaño de camada y aumento de fertilidad en padrillos. En la figura 8 A) se muestra al marcador molecular identificado para la presencia de HTM en cerdos, y en B) el fenotipo producido por la presencia de HTM en un ejemplar de la raza porcina Pietrain.

En corderos es posible la Identificación del síndrome de patas de araña y la identificación de un marcador de resistencia natural a la infestación por nemátodos. En bovinos es posible identificar a los portadores del gen de hipertrofia muscular en el bovino a través del Gen de la miostatina (MSTN). En la figura 9 A) y B) se muestra un análisis de secuencia de ADN para la identificación de mutaciones en el gen de miostatina de las razas de bovinos Belgian Blue y Piedmontese, en una comparación con el gen normal de la raza Holstein. En la figura 9 C) se muestran los fenotipos de las tres razas de bovinos analizadas.

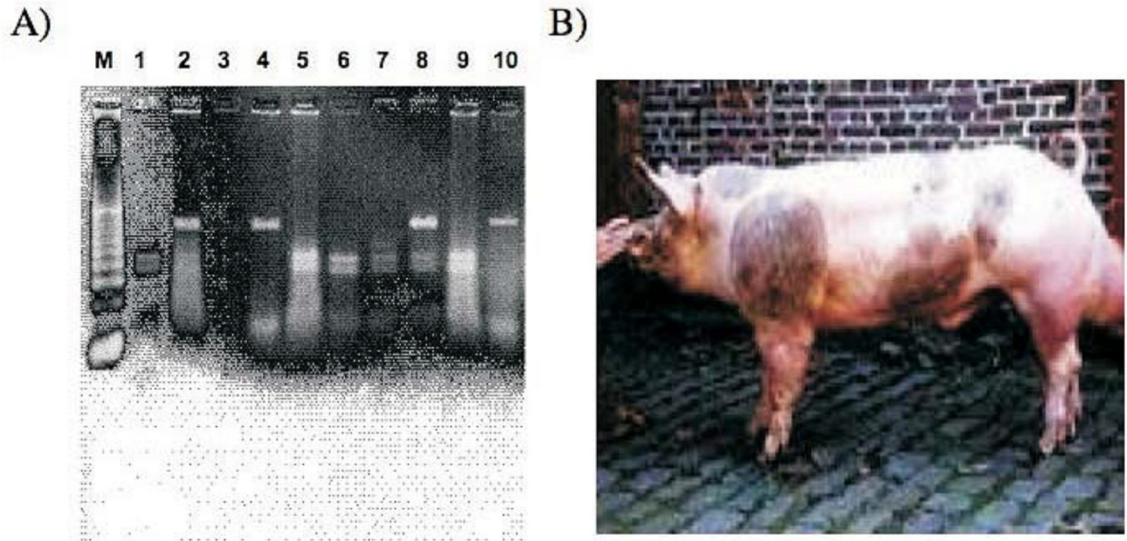


Figura 8. Prueba de hipertermia maligna en cerdos (HTM). Perfil electroforético de productos de PCR digeridos con la enzima Cfol para identificar los genotipos para el gen de la hipertermia maligna en cerdos. Carril M, marcador de tamaño molecular; carriles 1, 5, 6, 7 y 9, homocigotos normales (NN); carriles 2, y 8, heterocigotos normales (Nn); carriles 4 y 10, homocigotos recesivos (nn) que manifiestan el genotipo indeseable. B) Ejemplar de la raza porcina Pieltrain que manifiesta el genotipo nn, cuya expresión produce síndrome de hipertermia maligna que se asocia con la producción de carne pálida, suave y oxidativa (PSE) de baja calidad.

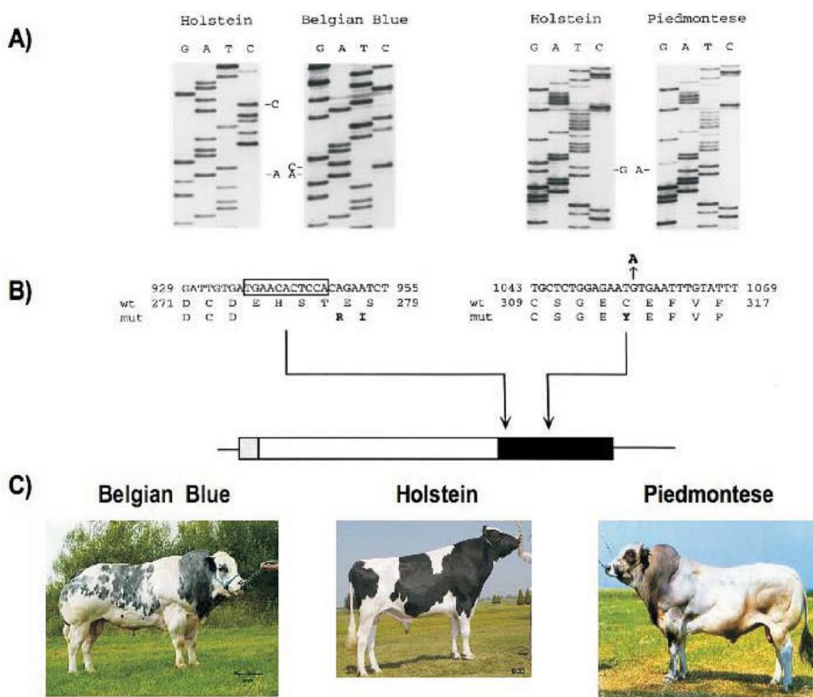


Figura 9. Mutaciones identificadas en la secuencia del gen de miostatina de bovinos. A) Auto radiografía que señala las mutaciones en la secuencia del gen de miostatina. B) Localización de la mutación de miostatina debida a una eliminación de 11 bases en la raza Belgian Blue, que presenta un fenotipo de doble musculatura; mientras que un cambio de G por A en la raza Piedmontese, le confiere también un fenotipo de doble músculo. C) Ejemplar de la raza Holstein cuyo gen de miostatina no contiene mutaciones y presenta un fenotipo de musculatura normal (Tomado de McPheron y Se Jin-Lee, 1997).

La detección de portadores antes se resolvía a partir de una prueba de progenie, idealmente con sus propias hijas, una prueba que lleva mucho tiempo y es costosa. Actualmente se realiza un análisis de ADN si la base molecular ha sido caracterizada o de marcadores en estrecho ligamiento con la mutación causal. En relación a esta aplicación,

se ha organizado la base de datos OMIA (<http://omia.angis.org.au/>), que reúne información de defectos y enfermedades de origen genético en más de 135 especies. El carácter de portador de un reproductor es asentado junto con el resto de la información productiva del mismo. Un fenotipo indeseable (que se sospeche de origen genético) puede ser confirmado a través de un test de laboratorio.

**Detección de enfermedades:** En la actualidad existen numerosas enfermedades hereditarias. Una vez que se tiene caracterizados molecularmente a los animales, la información de presencia del marcador en el hato, piara o manada puede ser usada para incrementar la frecuencia de este marcador asociado positivamente a una característica de interés, seleccionando los animales que posean dos copias de este marcador contra los que no lleven ninguna copia. En un hato típico, el uso de sementales que lleven dos copias del marcador (homocigoto) puede ser la vía más rápida para incrementar la frecuencia del marcador en el hato. El costo de la identificación de individuos portadores de genes y QTL superiores, es relativamente alto, pero este costo se puede recuperar al elevar el valor del animal superior (FAO, 2003). Ejemplos típicos en bovino son la enfermedad de BLAD, (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) o la CVM (Complex Vertebral Malformation).

La primera (BLAD) se debe a un defecto de la expresión de la proteína CD18 causado por una mutación en el gen que origina una alteración en el transporte de los leucocitos desde la sangre a los lugares de infección.

En el campo de la sanidad animal se han utilizado metodologías moleculares en el desarrollo de nuevos tratamientos de enfermedades, en la creación de vacunas como la de la fiebre aftosa, primer producto de la biología molecular, la de la tuberculosis bovina o de la brucelosis bovina, como en la creación de anticuerpos monoclonales (utilizados en vacunas y tratamientos), inmunoglobulinas, etc. También sus aplicaciones se refieren a aspectos que influyen en la producción y calidad de la leche, sobre todo en el ganado bovino.

**Diagnostico molecular de enfermedades.** La aplicación de la biotecnología del ADN a la salud animal, mediante vacunas más eficaces, baratas y resistentes combinadas con mejores instrumentos de diagnóstico, podría contribuir en medida importante a mejorar el control de las enfermedades, estimulando así la producción nacional de alimentos y la participación en el comercio ganadero. Actualmente existen alternativas que permiten visualizar la causa primaria con la probabilidad de cometer mas errores o falsos positivos. Los métodos genómicos permiten visualizar el ADN del genotipo de interés, ya sea detectando una región específica o la identificación una zona de resistencia a una enfermedad.

**Utilización de Marcadores en características productivas:** Numerosos estudios realizados durante las últimas cuatro décadas han puesto de manifiesto correlaciones estadísticamente significativas entre marcadores genéticos y caracteres de producción lechera. Los primeros estudios fueron enfocados principalmente hacia el análisis de los



grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos De los 10 grupos sanguíneos analizados por estos autores sólo el grupo B evidenció un efecto significativo sobre el porcentaje de grasa en leche, concluyendo que dicho marcador explicaría entre el 1,5 y 3,9% de la varianza total en el ganado lechero danés. Resultados similares fueron encontrados, en el ganado sueco, en la raza Holstein, asociaciones entre el grupo sanguíneo E con producción de grasa y leche, entre el grupo sanguíneo B con porcentaje de grasa en leche, y asociaciones entre el grupo sanguíneo S con diferencias en la producción de grasa.

En cuanto a los polimorfismos bioquímicos, se halló en la raza Holstein, asociaciones entre las variantes alélicas de las transferrinas (Tf) con diferencias en el rendimiento de leche y grasa. Al estudiar tres familias de medias hermanas de la raza Friesian, se observó asociaciones entre las variantes de post-albúmina (Pa) con rendimiento en litros de leche, y entre amilasa-1 (Am-1) con porcentaje de grasa. A pesar del esfuerzo realizado, los estudios de correlación entre los grupos sanguíneos y los polimorfismos bioquímicos con los caracteres de producción lechera no lograron grandes avances.

En los últimos años, el enfoque fue trasladado hacia la búsqueda de **loci candidatos** y/o hacia el rastreo del genoma mediante el uso simultáneo de un gran número de marcadores moleculares altamente polimórficos, del tipo microsatélite.

Se ha definido a los **loci candidatos** como aquellos genes que por su función biológica participarían en la expresión de un carácter cuantitativo y por lo tanto podrían explicar un porcentaje de su varianza fenotípica. Pueden mencionarse a modo de ejemplo las proteínas de la leche, la prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH), el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), etc.

### **Locis relacionados con caracteres lecheros**

Han sido documentadas correlaciones entre algunas de las variantes de las proteínas de la leche con el rendimiento y la composición del producto obtenido. Han sido observadas diferencias en el grado de correlación entre esas variables debido a distintas causas (métodos estadísticos utilizados, número de animales estudiados, tipos de marcadores, etc.)

Entre las proteínas detectadas en la leche se encuentran las caseínas ( $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\alpha$ S1-caseína y  $\alpha$ S2-caseína),  $\gamma$ -lactoglobulina y  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina. Un documento presentado por Giovambattista y cols. (1998) destaca las siguientes características de las proteínas de la leche.

**$\kappa$ caseína. (CAS $\kappa$ ):** Esta proteína constituye aproximadamente el 13 % de las caseínas totales. Mediante corridas electroforéticas, así como también a nivel de ADN, se han descrito dos variantes alélicas mayoritarias: A y B. La leche producida por animales de genotipo BB contiene mayores niveles de proteínas, grasa y sólidos totales. Además, las

diferencias en el contenido proteico de la leche, entre los animales CAS $\kappa$  AA y CAS $\kappa$  BB, se estimó en aproximadamente un 3%. Este locus puede explicar alrededor del 4% de la variación total en el contenido proteico. Además este genotipo se ha correlacionado con un mayor rendimiento en litros de leche. Fueron confirmadas en diferentes razas como Holstein, Friesian, Jersey, Ayrshire, Guemeys y otras. En las diferentes razas, no siempre se presentan las mismas asociaciones marcador - QTL. Si tenemos en cuenta que el ligamiento entre el QTL y el marcador genético es incompleto, podrían existir en la población diferentes haplotipos marcador-QTL. Así por ejemplo, el alelo B de CAS $\kappa$  estaba asociada a una disminución en el porcentaje de grasa. La leche producida por animales con genotipo CAS $\kappa$  BB posee propiedades superiores para la manufacturación de queso. La leche de tipo BB tienen menor tiempo de renina, cuajo más firme, y un mayor contenido en proteínas y sólidos totales, presenta mayor proporción de  $\kappa$ -caseína y micelas más pequeñas. Esta característica explica la **formación de un cuajo más firme y una mayor retención de sólidos**, lo que resulta en un rendimiento superior durante la producción de queso, comparada con la leche producida por animales con genotipo CAS $\kappa$  AA.

**$\alpha$ S1-caseína (CAS $\alpha$ S1):** Esta proteína constituye el 38 % de las caseínas totales presentes en la leche. Posee dos variantes principales denominadas B y C. Los individuos CAS $\alpha$ S1 BB tenían un rendimiento en litros de leche significativamente mayor que los animales CAS $\alpha$ S1 BC. Estas observaciones indicarían la existencia de una fuerte correlación entre el alelo B y una mayor producción lechera. Sin embargo, no se hallaron asociaciones significativas entre los genotipos de CAS $\alpha$ S1 con producción lechera en vacas de la raza Holstein.

En las razas lecheras más difundidas, como las Holstein-Friesian, el alelo B se encuentra próximo a la fijación; este hecho podría haber sido consecuencia de la fuerte presión de selección ejercida sobre dichas razas durante el último siglo.

**$\beta$ -lactoglobulina (LG $\beta$ ):** La  $\beta$ -LG es la principal proteína del suero en la leche de los ruminantes, constituyendo el 50% de las proteínas presente en el suero. Aunque todavía no está clara su función fisiológica, se supone que podría participar en el transporte y metabolismo del retinol y los ácidos grasos.

Al igual que en el caso de  $\kappa$ -caseína, se han descrito dos variantes alélicas mayoritarias: A y B. La expresión diferencial de los alelos A y B de  $\beta$ LG ha sido observada en diferentes poblaciones de ganado bovino lechero.

Finalmente, cabe mencionar que no todos los trabajos han hallado correlaciones estadísticamente significativas entre los genotipos de LG $\beta$  y los caracteres de producción lechera.

**$\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -AL):** La  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LA) constituye el 20% de las proteínas presentes en el suero de la leche. Hasta el momento han sido detectadas tres variantes: A, B y C en la raza Holstein, la variante A con una mayor cantidad de leche, proteínas y grasa. La

variante B fue asociada con mayores porcentajes de proteína y grasa, observándose valores intermedios en los animales heterocigotas.

A pesar de la importancia fisiológica de **la hormona Prolactina** para la lactancia, son escasos los trabajos sobre asociación entre PRL y producción lechera. Mediante la técnica de Southern Blot, se estableció una correlación entre las variantes de PRL y caracteres de producción lechera en una familia élite de la raza Holstein. Es por esta razón, que hoy en día podría considerarse como un QTL.

**Hormona de Crecimiento (GH):** La hormona de crecimiento es un péptido secretado por la adenohipófisis cuya función más importante es la de favorecer la síntesis proteica, estimulando de esta manera el crecimiento. Así mismo, es importante el estímulo de la GH tanto en el desarrollo de la glándula mamaria, como en la lactancia. Por lo tanto, el análisis de los polimorfismos presentes en la GH y sus asociaciones con los caracteres de producción lechera es de fundamental importancia.

**Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).** En bovinos el **Complejo Mayor de Histocompatibilidad** (denominado **Bovine Lymphocyte Antigen, BoLA**), corresponde a un grupo de loci ubicados en el **cromosoma 23 (BTA23)**. El BoLA ocupa un rol central en la respuesta inmune. Este complejo es de gran importancia para la adaptación del individuo al medio, por lo que influye directa o indirectamente sobre los caracteres de producción. Numerosos estudios han demostrado la asociación entre el BoLA y caracteres de importancia fisiológica como fertilidad susceptibilidad o resistencia a enfermedades caracteres de producción, parámetros de crecimiento.

Entre los genes más estudiados se pueden mencionar el locus de Clase II BoLA-DRB3. Se ha podido comprobar la correlación entre la presencia de algunas de las variantes alélicas encontradas para este locus, con resistencia o susceptibilidad a enfermedades como la leucosis bovina, mastitis, parásitos intestinales, etc. Además se han encontrado correlaciones entre loci de clase I, como el BoLA-A y resistencia o susceptibilidad a mastitis

Estas asociaciones resultan de interés, ya que numerosas evidencias han demostrado que los animales portadores de estas enfermedades presentan una importante disminución en la producción. Sin embargo, no siempre se han encontrado correlaciones entre loci de Clase I y II del BoLA, con fertilidad y caracteres de producción. La utilización de los STRs para el mapeo de QTLs ha permitido localizar regiones cromosómicas, que podrían ser portadoras de genes implicados en la producción lechera. Por ende, el análisis del STR., no sólo permite la identificación de los animales portadores, sino que también posibilitará estudiar el efecto de la región cromosómica correspondiente, sobre la producción lechera en esta raza y en otras razas lecheras.

## FUNDAMENTO DE LA IDENTIFICACIÓN DE QTLs

El principio que subyace a la identificación de QTLs es simple y **se basa en el desequilibrio de ligamiento entre un gen o genes que afectan a una variable cuantitativa y un marcador molecular**. En una población F2 originada por cruzamiento entre **QQ y qq para un QTL** y entre **MM y mm para un marcador**, la diferencia en una variable cuantitativa determinada entre las dos clases homocigotos será igual a:  **$a(1 - 2c)$**  donde **a** es el **efecto aditivo** y **c** la **tasa de recombinación entre QTL y marcador**. Si el marcador estuviera sobre el propio QTL, la recombinación **c** será cero (0) mientras que si el QTL y el marcador están en cromosomas distintos o muy separados **c** sería igual a 0.5 y no habría diferencia entre las medias de los individuos MM y mm. Con la utilización de estadísticas apropiadas pueden utilizarse marcadores ya conocidos en su posición como puntos de referencia para estimar la localización del QTL. **El QTL es una región cromosómica que ha sido vinculada por métodos estadísticos con un la segregación de un fenotipo cuantitativo**. Esta región puede contener uno o varios genes de relevancia o puede corresponder a polimorfismos en los exones de un gen pero también a secuencias reguladoras. Gen y QTL son conceptos diferentes.

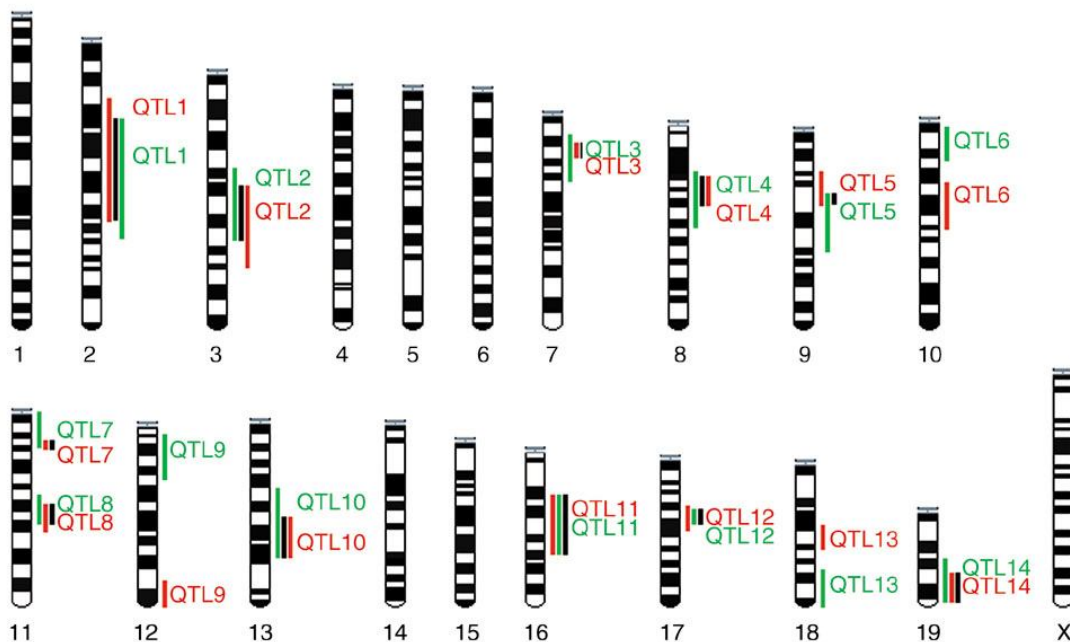


Figura 10. Visualización simultánea de la superposición de QTL. QTL medido para el mismo rasgo, pero en diferentes cruces del ratón (anotado con diferentes colores) se representan como barras verticales al lado de los cromosomas. Las regiones de consenso QTL (en negro) presentan las coincidencias comunes a todos los cruces.

En algunas ocasiones los avances hacia la identificación del gen responsable en una región previamente identificada como QTL ha tenido éxito dependiendo de algunos genes que han ejercido una notable influencia sobre caracteres de interés (genes mayores) Ej: el

gen de la hipertrofia muscular, la miostatina, o el DGAT1 en bovino, el gen boorola en ovinos o los genes de la calidad de carne. Actualmente la incorporación a los programas de mejora de los QTL es una realidad en especies como porcino, bovino de carne y leche.

## **IDENTIFICACIÓN DE QTL DISEÑOS EXPERIMENTALES**

### **1- Una población apropiada en la que se segreguen los QTL de interés**

- **Hermanos enteros o ½ Hermanos en Bovinos de carne**
- **Diseño de Medias Hermanas Paternas (Dauther Designs, Paternal half sibs)/ diseño de hijas en bovinos de leche**

Esta metodología se basa en el **estudio de la descendencia de machos heterocigotos para un locus determinado**. Teniendo en cuenta el alelo que reciben del padre, las hijas pueden ser clasificadas en dos grupos de medias hermanas paternas. Debido a que los alelos correspondientes a un locus marcan las regiones cromosómicas homologas a las que se encuentran ligados, pueden ser usados en este sentido como marcadores genéticos. Si el marcador se encuentra estrechamente ligado a un QTL, las crías al recibir un alelo determinado del padre heredan simultáneamente una de las dos posibles regiones cromosómicas homologas que incluyen el QTL. De esta manera, los dos grupos de medias hermanas paternas deberían diferenciarse para el carácter cuantitativo. Por lo dicho anteriormente, sólo serán informativos aquellos machos que sean heterocigotos para ambos loci.

Si el ligamiento entre el marcador y el QTL no es completo, los dos grupos de medias hermanas no serán homogéneos para el QTL, debido a que por efecto de la recombinación un porcentaje de las hijas recibirán la región cromosómica recombinada. Este efecto reduce la diferencia entre ambos grupos para el carácter estudiado.

El análisis consiste en comparar los fenotipos de los grupos que recibieron esos alelos. Los QTL surgen de la comparación entre razas que formaron la población experimental, por ej cebuinas y británicas. Otra forma que se ha implementado es la creación de familias de hermanos enteros producidas por multiovulación y transferencia embrionaria.

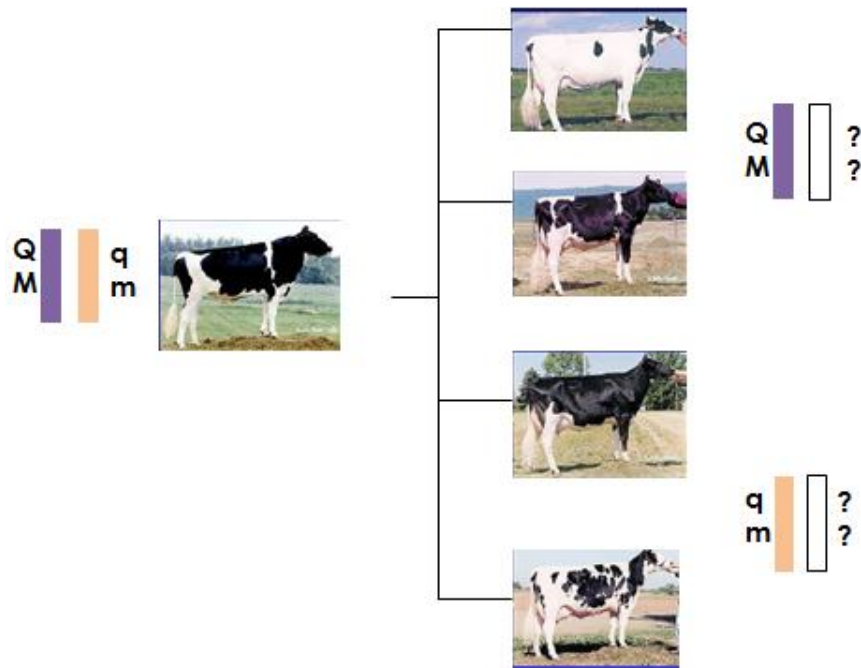


Figura 11. Diseño de Hijas.  
Daughter desing.

- **Diseño de Nietas (Granddaughter Designs) en bovinos de leche**

El método denominado "Diseño de Nietas" se basa en la caracterización de los hijos de machos de elite que son heterocigotos para un determinado marcador. Las crías se dividen en dos grupos de acuerdo al alelo que hayan recibido del macho de elite. Posteriormente, las crías son evaluadas para el carácter cuantitativo a través del test de progenie, comparando los valores medios obtenidos para cada grupo. En leche el genotipo de los hijos es asociado al fenotipo de las nietas que están en control lechero. Puede utilizarse como alternativa, el valor de cría en lugar del test de progenie. Este método permite reducir el número de animales tipificados para cada marcador, a expensas del aumento en el número de crías evaluadas para el carácter cuantitativo. Por otra parte, sólo se requiere la recolección de muestras de semen en los centros de inseminación. Otra ventaja de este método es que al trabajar con test de progenie en lugar de datos individuales de producción, se reduce el error de la varianza del carácter cuantitativo evaluado.

En este diseño, la diferencia esperada entre las medias de producción de ambos grupos, estimada a través de los test de progenie de los hijos del macho de elite, sería la mitad de la diferencia esperada entre los datos individuales de dos grupos de crías. Esto disminuye el poder de resolución del diseño de nietas en comparación con el de medias hermanas. Sin embargo, esta desventaja es compensada ampliamente, dado que la varianza entre los test de progenie es menor que la varianza entre los valores individuales de producción utilizados en el diseño de medias hermanas.

El punto clave es el numero de meiosis informativas que debe ser maximizado por el diseño experimental; para el mismo número de animales es mejor contar con hermanos enteros que medios hermanos; a igual número de genotipos el diseño de nietas tiene mas

poder estadístico que el de hijas; la retrocruza es más eficiente para detectar dominancia pero cuando se requiere hacer una revisión del genoma la F2 es más eficiente.

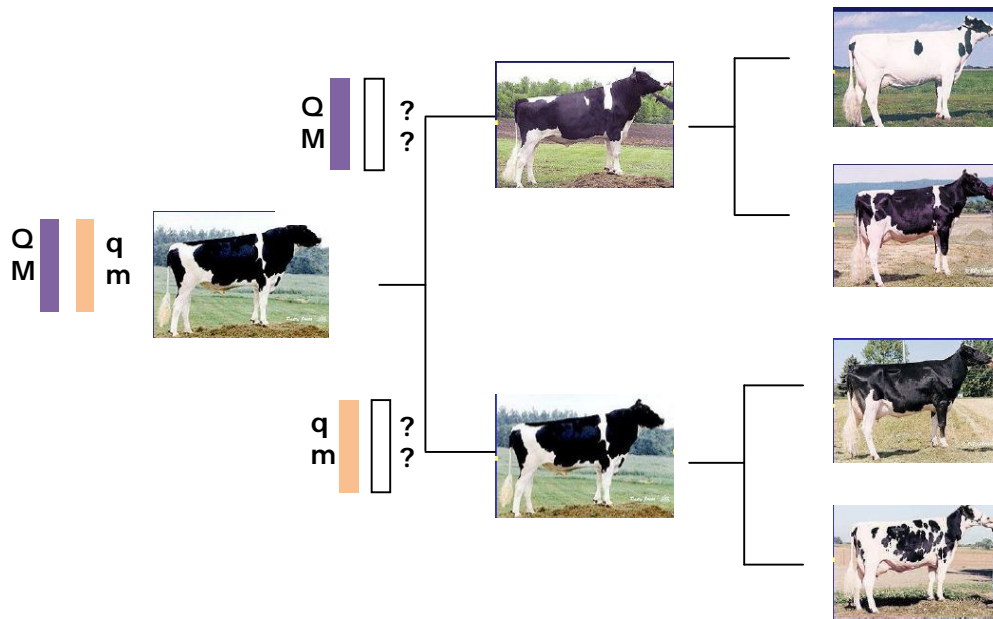


Figura 12. Diseño de Nietas. Granddaughter desing.

## 2- Conjunto de marcadores moleculares polimórficos

El punto clave es cuántos marcadores se deben utilizar. En general se trata de tener una cobertura completa del genoma para asegurar que ninguna región cromosómica queda sin ser analizada. Se puede realizar con intervalos relativamente grandes que luego deberán ser cubiertos con nuevos marcadores. En la práctica se puede utilizar un marcador cada 20 cM. En general la limitante es la cantidad de meiosis por lo que es innecesario saturar el genoma con marcadores.

## 3- Metodología estadística (para estudiar la segregación de los marcadores asociados con la variabilidad fenotípica)

En general los principios del análisis estadístico para identificar QTL son simples. En el caso más sencillo los individuos se clasifican según el genotipo para un marcador. Si mediante la aplicación de un estadístico (análisis de variancia) se comprueban diferencias significativas en el fenotipo estudiado entre las clases genotípicas puede concluirse que existe un QTL ligado a ese marcador.

Cuando se usan marcadores individuales para el análisis, la magnitud del efecto del QTL está confundida con su distancia al marcador. En este caso el efecto del QTL está subestimado. Esto significa que se puede obtener la misma señal estadística de un QTL débil que está próximo al marcador que de uno fuerte mucho más apartado. Para superar esta limitación se desarrolló la estrategia conocida como mapa en intervalos. En este caso un par de marcadores en un cromosoma se analizan simultáneamente y se determina la

proporción más probable para el QTL dentro del intervalo. Existen diversos criterios con respecto a la rigurosidad de los niveles de significancia para reconocer la existencia de un QTL.

Los resultados de experimentos de búsqueda de QTL deben ser cautos, Debido a limitaciones de los diseños experimentales existe un sesgo en el número y magnitud de los efectos de los QTL reportados. Con la metodología actual solo los QTL de mayor efecto pueden ser detectados, sesgo que es inversamente proporcional al rigor para fijar niveles de significancia y es mayor para los efectos de dominancia que para los efectos aditivos. Por eso no deben extraerse conclusiones definitivas sobre el número de loci que afectan a una variable.

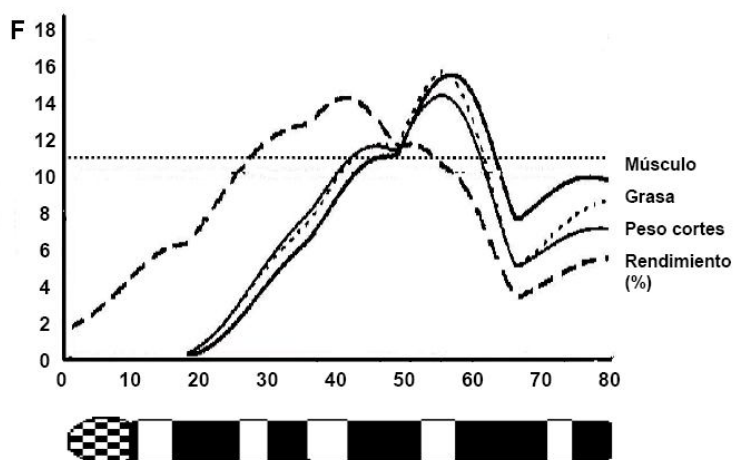


Figura 13. Magnitud del efecto del QTL para crecimiento en el cromosoma 13 bovino. Experimento realizado por Stone et al., 1999. A Primary Screen of the Bovine Genome for Quantitative Trait Loci Affecting Carcass and Growth Traits.

Se han desarrollado métodos estadísticos más sofisticados para mejorar el poder de detección de QTL, tales como

el análisis simultáneo de varios atributos, el análisis en intervalos múltiples y el uso de la estadística bayesiana. El desarrollo de nuevos modelos estadísticos para la búsqueda de QTL es un área muy dinámica en investigación y continuamente se presentan nuevas alternativas de análisis.

El QTL se asocia a una región cromosómica que tiene un pico máximo de significancia, y como en todo caso de inferencia estadística lleva implícito un intervalo de confianza, que con cierto grado de probabilidad contiene el gen o genes buscados. Existen distintos métodos estadísticos para determinar el intervalo de confianza de un QTL.

La información referente a QTL en las distintas especies ha sido sistematizada en diferentes bases de datos para cada especie y son accesibles a través de Internet.

### Del QTL al gen (y al QTN)

La identificación del QTL es sólo la primera etapa del proceso que tiende a la individualización de genes responsables de variables de relevancia económica en animales domésticos. Este paso debería ser seguido por la construcción de un mapa físico de la región, determinación de la secuencia de ADN y la identificación de genes en ella. La capacidad de detección de QTL es limitada. La posición de un QTL está entre 10 a 30 cM y ese intervalo puede contener cientos de genes y entonces no resulta práctico para hacer el



mapa físico. El intervalo de confianza a un QTL puede corresponder a una zona rica (varios genes candidatos con funciones en asociación con el fenotipo) o pobre en genes. Un mayor tamaño de la población podría aumentar el tamaño de las meiosis y refinar la posición del QTL. La distancia más apropiada para iniciar un mapa físico (no más de 1 a 5 cM) requeriría la disponibilidad de miles de animales. Esto es sencillo para animales modelo o de laboratorio pero en animales domésticos. En bovinos lecheros lo que se practica es la identificación de un segmento cromosómico común a todos los individuos que se asumen tienen el mismo genotipo para un QTL (generalmente son individuos emparentados). Los genes DGAT1 y GHR han sido detectados en los cromosomas 14 y 20 respectivamente como candidatos firmes y afectan variables de producción de leche.

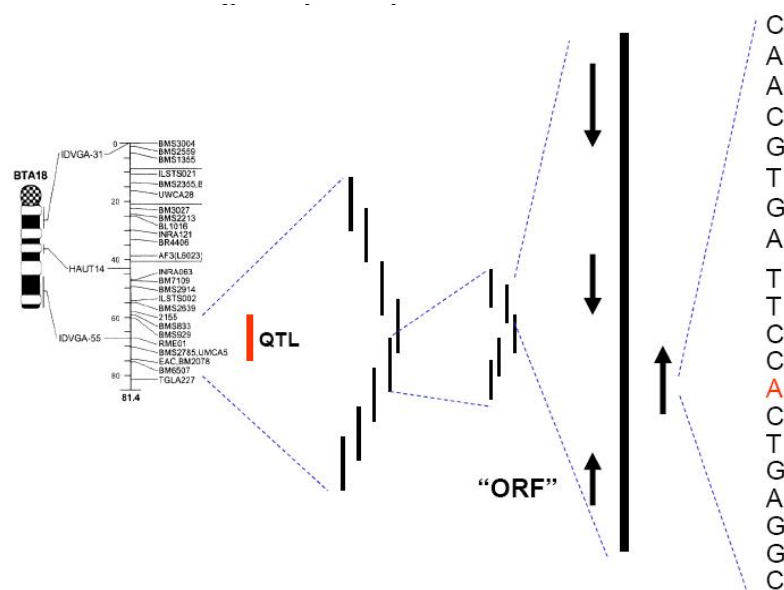


Figura 14. Identificación de genes por su posición en el genoma.

También dentro de la genómica comparativa el uso de QTL ha permitido el estudio de especies con antecesor común. Es posible identificar en distintas especies los mismos genes que cumplen funciones similares. Esta homología puede extenderse a QTL vinculados a fenotipos similares en especies distintas. Para la identificación del gen o genes de un QTL también se propone combinar la estrategia posicional con la estrategia de genes candidatos y el uso de mapas comparativos entre especies. Determinada la posición de un QTL en una especie, pueden definirse genes candidatos para el seleccionando genes que ya han sido caracterizado en otras especies (humanos y ratón) y de los que se sabe su función y posición. Así se reduce el número de genes candidato para un QTL. La confirmación definitiva debe provenir de un experimento, por ejemplo sustitución de alelos y medición de efectos.

Una vez que se ha identificado un gen correspondiente a un QTL hay que determinar que polimorfismo da origen a la diferencia fenotípica cuantitativa entre poblaciones. Generalmente ese polimorfismo es un SNP pero no siempre es posible identificar este polimorfismo dado que se producen muchas mutaciones y pocas son funcionales, y esta situación se complica si ciertos alelos tienen un haplotipo común. Para el gen de la Leptina se han detectado polimorfismos en el promotor, en el exón 2 y 3 pero todavía es controvertido el efecto real en el fenotipo.

Actualmente ya están en el mercado una serie de paneles de marcadores moleculares ofrecidos por empresas privadas. Estos paneles son principalmente de aplicación en bovinos de carne y leche y están integrados para un número variable de SNP que corresponden a marcadores directos.

### Tipificación Selectiva (Selective Genotyping)

El método de tipificación selectiva se basa en la elección de aquellos animales que se encuentran en los extremos de la distribución para el carácter de interés, y su posterior tipificación para los marcadores genéticos. Esta metodología se fundamenta en el hecho que la selección sobre un carácter cuantitativo podría cambiar las frecuencias génicas en la población segregante. Una diferencia significativa entre las frecuencias génicas de las colas de la distribución de la producción (alta y baja) en la F2 o en la población base puede servir como test para el ligamiento marcador-QTL.

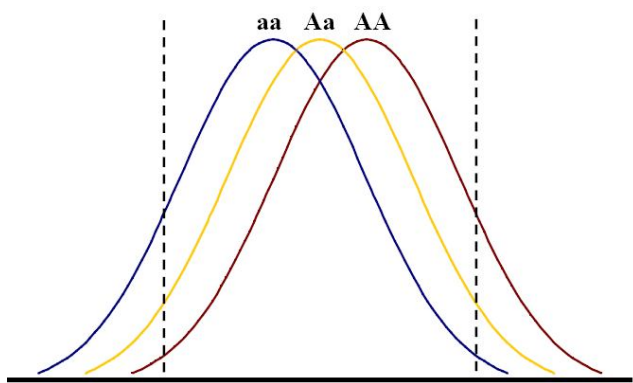


Figura 15. Selección de los animales que se encuentran en los extremos.

La ventaja de este método consiste en que reduce el número de animales tipificados a expensas de un aumento en el número de animales registrados para el carácter en estudio.

Cuando la proporción seleccionada en las colas es pequeña (10% o menos), se puede obtener una reducción importante en el número de animales tipificados, a expensas de un aumento en la cantidad de crías evaluadas para el carácter en estudio. Este método es fácilmente aplicable para el estudio del ligamiento marcador-QTL en rebaños de producción lechera, dado que en estos casos se dispone de un gran número de datos. Puede aplicarse seleccionando uno o dos de los caracteres más importantes, por ejemplo, producción de leche y contenido proteico. Sin embargo, la principal desventaja de la tipificación selectiva es que no puede ser aplicada simultáneamente a más de dos caracteres independientes, porque a pesar de la pequeña

proporción de animales seleccionados para cada carácter, se tendría que tipificar prácticamente a todas las crías.

**Selección asistida por Marcadores y genes:** Independientemente de cuales sean los que se utilicen, los marcadores genéticos pueden aplicarse para identificar algún locus del genoma, que se encuentre cerca de un gen específico que codifique una característica en particular. Los marcadores genéticos han permitido detectar algunos QTL en los cromosomas y la identificación de dichos marcadores, y su subsiguiente ubicación en los mapas de ligamiento han permitido identificar las regiones cromosómicas donde residen éstos. La distancia entre el marcador y el gen o QTL que codifica una característica cuantitativa es importante para su efecto, es decir, es necesaria una distancia entre 15 a 50 centimorgan (cM, unidad arbitraria utilizada para medir distancia entre locus) para lograr un efecto de medio a alto o de 5 cM para garantizar un efecto mayor. Una vez identificado y medido el efecto de un QTL, es posible incorporarlo a esquemas de mejoramiento genético. De esta forma, el uso de la genómica es útil **para mejorar características productivas que se limitan por el sexo, que tienen baja heredabilidad, que son costosas de medir o para aquellos que aparecen más allá de la vida media del animal (aparición tardía), o que se miden sólo después sacrificio del animal.**

**Tabla 3. Algunos ejemplos de QTL detectados para diferentes caracteres y en diferentes especies ganaderas**

<b>Bovino lechero</b>		<b>Bovino de carne</b>		<b>Porcino</b>	
<b>Carácter</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Carácter</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Carácter</b>	<b>Cromosoma</b>
Cantidad de leche	6, 14, 18	Peso nacimiento	1, 6, 19	Crecimiento	1, 3, 4, 6, 7, 8, 13, 14
Grasa y % grasa	6, 14, 19, 26	Peso destete	12	% jamón y lomo	X
Proteína y % proteína	6, 7, 14, 19, 20, 26	Peso año	6, 12	Grasa intramuscular	7
Persistencia	11	Peso canal	6	Espesor grasa dorsal	4
Células somáticas	15	Rendimiento canal	5	Calidad de carne: pH, capacidad retención agua, coloración, firmeza	2, 4, 7, 12
Fertilidad	1, 7	Área <i>L. dorsi</i>	6, 14	Tasa de ovulación	8
		% grasa canal	4		
		Veteado	17, 29		
		Terneza	5, 15, 29		
		Tasa ovulación	5, 7, 19		

Tabla 4. Algunos ejemplos de genes que se analizan de una manera comercial en programas de mejora de animales

	Locus/gen	Nombre	Cromosoma	Carácter o caracteres afectados
Especie porcina	Hal/RYRI	Receptor de la rianodina	6	Rendimiento canal, eficiencia Transf., alimentos, carnes PSE
	RN/PRKAG3	Subunidad gamma de la quinasa AMP activada	15	Rendimiento tecnológico, rendimiento canal, velocidad crecimiento
	HFABP	<i>Heart fatty acid binding protein</i>	6	Grasa intramuscular
	CAST	Calpastatina	2	Calidad de carne (terneza)
	KIT	Receptor del factor de crecimiento de las células totipotentes	8	Coloraciones blancas de la capa
	MC1R	Receptor 1 de la melanocortina	6	Coloraciones rojas y negras de la capa
	ESR	Receptor de estrógenos	1	Tamaño de camada
	PRLR	Receptor de la prolactina	16	Tamaño de camada
	FUT1 y FUT2	Alfa fucosiltransferasa	6	Resistencia a E. coli
	SLA	Antígeno leucocitario porcino	7	Grasa dorsal, área del lomo, calidad de carne
MC4R	Receptor 4 de la melanocortina	1	Ingestión de alimento	
Especie bovina	DGAT1	AcylCoA:diacilglicerolaciltransferasa	14	Cantidad y composición lechera
	CAPNI	$\mu$ -calpaina	29	Terneza
	CAST	Calpastatina	7	Terneza
	LOX	Lysil oxidasa	7	Textura de la carne
	LEP	Leptina	4	Engrasamiento canal
	TG	Tiroglobulina	14	Grasa intramuscular
	MSTN	Miostatina	2	Desarrollo muscular, calidad de carne, eficiencia transf. alimentos
Ovino	PRNP	Proteína prión		Resistencia susceptibilidad al scrapie
	CLPG	Callipyge	18	Composición de la canal
	FecB/BMPRI1B	Receptor tipo IB de la proteína de la morfogénesis de hueso	6	Tasa de ovulación

La cría animal moderna comenzó con la utilización de sistemas de cruce entre animales para satisfacer necesidades humanas inmediatas, posteriormente los cruzamientos se operaron para el logro de metas bien establecidas: mayor producción de leche y carne, producción eficiente, y camadas más numerosas. Estos cruzamientos se realizaban entre individuos cuya información productiva o fenotípica contribuía a identificar los genes que expresan rasgos productivos. De este modo, la selección tradicional se basaba en el modelo poligénico de características cuantitativas (**BLUP** por sus siglas en inglés; **best lineal unbiased production**), que emplea la información fenotípica y el pedigrí para establecer valores de cría individuales en los animales. Los genes que contribuyen para que se expresen las características de comportamiento productivo son desconocidos y por ello se han utilizado registros de comportamiento fenotípico, así como herramientas para inferir el mérito genético de los animales (**diferencia esperada en la progenie, DEP** en bovinos de carne; evaluación genética integral en ganado bovino de leche, comportamiento productivo en cerdos, ovinos y cabras). Estas herramientas son útiles para el mejoramiento de animales, sin embargo, no se sabe cuáles son los genes que contribuyen a la generación siguiente, mas aun en características complejas como peso al nacer, peso al destete, producción de leche, producción de huevo, reproducción, calidad de canal, entre otros, y que están controlados por muchos genes y afectados por el ambiente (por ejemplo, condiciones de alimentación), por lo que el estudio de la variación dentro de genes está teniendo un gran

impacto sobre el fenotipo de animales de granja. El éxito de las herramientas mencionadas se basa en la creencia de que hay un grupo de genes que contribuyen cada uno con poco efecto; tal es el caso de los caracteres complejos (como el de crecimiento) que son producto de la expresión de varios genes ligados. A este modelo se le conoce como infinitesimal y también se basa en la selección de los posibles progenitores a través de valores de cría cuyo modelo se basa en BLUP.

El modelo que intenta integrar la genética cuantitativa y molecular sería una meta; donde en el modelo clásico de la genética cuantitativa el fenotipo es integrado por efectos genéticos y ambientales ( $P = G + E$ ) y puede ser actualizado incluyendo un nuevo término que representa el efecto de los genes candidatos o QTL, donde ( $P = G + E + G_m$ ).

La nueva información generada con marcadores genético-moleculares, genes candidatos y QTL, cada vez es más abundante, y ésta puede ser utilizada para diseñar un esquema de SAM o SAG.

Los genes principales (genes mayores) son genes individuales que contribuyen con una proporción significativa en la variación de características económicamente importantes. La biología molecular puede utilizarse para identificar y caracterizar a estos genes. Las decisiones de selección tomadas sobre otras técnicas o modelos de selección, cuyo valor económico estriba en estimar el valor de cría de todos los genes que contribuirían con la característica dada han sido muy útiles, pero si a estas se les agrega la detección o la presencia de un marcador genético-molecular, la selección animal se ejerce con mayor precisión, sin embargo, **la SAM es una herramienta que asiste pero no reemplaza las técnicas tradicionales de selección animal**. En la SAM se utiliza información directamente aportada por el ADN de un candidato a ser seleccionado, juntamente con sus registros productivos y los de individuos emparentados.

La SAM permite realizar una selección objetiva y confiable de las variaciones específicas del ADN que se encuentran asociadas con una diferencia cuantificable, o efecto sobre un determinado carácter o complejo de caracteres. Es importante considerar que la realización de SAM funciona mejor cuando se efectúa en características complejas, como el crecimiento y el marmoleo (grasa intramuscular en el ganado bovino), las cuales se encuentran asociadas con varios genes que contribuyen juntos para estas características.

Actualmente en Francia las tres principales razas de bovino lechero, Hostein, Normande y Mont bellard, están sometidas a un programa de selección asistida y se consideran 12 QTL identificados cada uno por 2-4 marcadores. También Nueva Zelanda ha puesto un programa similar.

Otra utilidad vinculada pero que no implica la selección de reproductores, es la clasificación de individuos con una determinada capacidad productiva (ya sea potencial de crecimiento o facilidad de engorde, por ejemplo). La identificación a priori de animales con distinta capacidad productiva permite optimizar el manejo y la alimentación y

predeterminar el destino hacia cierto mercado. A esta estrategia se la conoce como **Manejo Asistido por Marcadores (MAM)**.

El impacto más importante de la SAM será a través de la reducción del intervalo generacional y el aumento de la exactitud de la estimación de los valores genéticos y precisión de selección.

**Los paneles comerciales** son aquellos genes identificados que están involucrados en la producción animal. Su búsqueda fue realizada en base a dos alternativas experimentales. Por un lado, se empezó a trabajar en la caracterización de genes cuyo rol fisiológico o bioquímico era bien conocido: designados como genes "candidatos" para explicar la variabilidad de cierta característica (Ej.: las proteínas de la leche y sus polimorfismos y asociación con producción. Por otro lado la búsqueda surgió y a diferencia del anterior ante el desconocimiento de los genes involucrados directamente con muchas variables productivas. Para la identificación de estos genes, se diseñó una estrategia denominada posicional. En este caso, en base a una estructura poblacional adecuada (experimental o comercial) se monitoreaban regiones cromosómicas que segregaban de padres a hijos y que se asociaban estadísticamente a diferencias en el nivel de una variable de interés, sin ninguna información previa sobre el gen o genes involucrados: pretendiendo identificar regiones cromosómicas que contengan los genes involucrados, se popularizó la sigla QTL (por "Quantitative Trait Loci" o "Loci que controlan variables cuantitativas").

Luego de la identificación de QTL se realiza la búsqueda de la posición del locus de interés (mapa fino), la reconstrucción de la secuencia mediante el ensamblado de clones (mapa físico) y la identificación de polimorfismos en la región con asociación a la variable en estudio. Este proceso es largo y costoso y a pesar del gran número de QTL reportados en bovinos, pocos genes han completado ese proceso en su totalidad.

La evaluación de candidatos y búsqueda de QTL es parte de la genómica estructural. La genómica funcional, principalmente los estudios de expresión génica, contribuyeron a caracterizar a los genes y confirmar su efecto. El interés por transferir la tecnología al sector productivo llevó al diseño de la estrategia de selección con marcadores indirectos que flanquearan al alelo causal desconocido. Esto obligaba a una selección dentro de familias y a monitorear regularmente la fase de ligamiento. Esta estrategia tuvo poca difusión, ya que rápidamente se pasó a la utilización de marcadores directos, ubicados en los propios genes de interés.

El descubrimiento de los primeros genes asociados a variables continuas, permitió develar la base genética de la variación cuantitativa. Incluso, se llegó a poner en duda la validez del modelo infinitesimal que es la base conceptual de la misma.

El primer marcador comercial para bovinos de carne correspondía a un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en el gen de Tiroglobulina y afectaba el nivel de grasa intramuscular (marbling o veteado). Poco tiempo después, se presentó un marcador en el

gen de Calpastatina, asociado a diferencias en terneza de la carne y posteriormente se agregó el gen de la Leptina, asociado a variables de interés tanto en ganado de carne como de leche.

Evaluaciones a nivel mundial pronto confirmaron que estos polimorfismos, en forma individual, explicaban una fracción muy pequeña de la variabilidad genética. Pero en poco tiempo se fueron reportando más polimorfismos asociados a diversas variables de producción. Desde el punto de vista comercial, a medida que se fueron descubriendo estos polimorfismos, los mismos se fueron integrando a paneles de marcadores, en un número de hasta decenas según el atributo en particular.

Desde el punto de vista de la investigación científica, fueron propuestos diferentes modelos para la interpretación de experimentos de localización de QTL en bovinos de leche y cerdos sugiriendo que podría tratarse de una distribución asimétrica que en definitiva lo que indica es que en el control de una variable cuantitativa intervienen pocos genes, de efecto "fuerte", o sea explican una proporción importante de la variabilidad, mientras que el resto es explicado por un grupo muy numeroso de genes de efecto pequeño. Aún así, el análisis en retrospectiva de los resultados experimentales de varias otras especies parece indicar que el modelo infinitesimal (un gran número de loci causales, cada uno de pequeño efecto, la base de la genética aditiva o cuantitativa) no parece ser erróneo, lo que complica un poco más el aprovechamiento de la información molecular en selección asistida.

Un nuevo progreso tecnológico, superador a la utilización de paneles de marcadores moleculares, está dado por la **"selección genómica"**. En este caso, un número muy elevado de marcadores cubriendo todo el genoma garantizaría que todos los loci de relevancia estuvieran en condiciones de desequilibrio de ligamiento con los mismos, por lo que su efecto podría ser cuantificado. De esta forma, la asociación entre genotipos y valor productivo permitiría la estimación de un valor génico molecular global. Debe notarse que la selección genómica tiene una diferencia conceptual con estrategias anteriores: **con la densidad adecuada (que asegure el desequilibrio de ligamiento), pueden usarse SNP anónimos y ya no es necesario ubicar SNP en genes candidatos.**

La selección genómica requiere determinar los genotipos de un elevado número de marcadores en un mismo individuo. Desde el 2007 está disponible un chip con alrededor de 54.000 marcadores (SNP). Este chip, patrón de referencia para la evaluación genómica en bovinos es el resultado del trabajo de diversas instituciones (The Bovine HapMap) y continuación de la secuenciación del genoma de la especie (The Bovine Genome Sequencing and Analysis).

La propia estructura y dinámica de la población de bovinos de leche ha permitido una rápida implementación de la tecnología genómica. Es posible lograr precisiones de alrededor de 0,70, lo que es muy superior al valor determinado por el promedio de los padres y tiene relevancia en el caso de toros jóvenes.



Figura 16. Chip de DNA de Affymetrix, empleado para detectar expresión de genes de humano, a la izquierda, y de ratón, a la derecha.

En bovinos de carne el progreso es más lento, dado que hay diferencias entre las diferentes razas (por ejemplo en la fase de ligamiento) y no hay información fenotípica precisa. En este caso, la selección genómica permitiría

explicar hasta 50% de la variabilidad genética, con una precisión de 0,50-0,70 (equivalente a contar con ~6 - 16 crías con  $h^2 = 0,25$ ). Ya están en evaluación chips con casi 800.000 SNP.

También es muy importante el número de individuos con registros utilizados en el análisis de asociación.

La selección genómica se presenta como la técnica a utilizar en la selección animal en un futuro. El uso generalizado de la misma, y en qué especies será más accesible falta dilucidar. Para mejorar la precisión aun se debe optimizar el número de marcadores a analizar y el costo razonable de acuerdo al sistema de producción. En Argentina comienzan lentamente a demandarse los paneles de marcadores, por lo que el cambio llevará más tiempo que en países desarrollados.

De la variabilidad observada en los fenotipos de la población, sólo una fracción es explicada por diferencias en el efecto aditivo de los genes: la heredabilidad ( $h^2$ ). La situación ideal sería aquella en la que los marcadores explican toda la variabilidad genética subyacente, implícita en la heredabilidad de un atributo.

Una diferencia importante al considerar la efectividad de una alternativa de selección es si la variable de interés puede ser medida en los animales. Variables relacionadas a aptitud reproductiva, a composición corporal o calidad de producto (ej: la carne) son muy difíciles de medir en condiciones comerciales normales y la información molecular podría hacer una importante contribución y al no depender de genes candidatos, con la selección genómica probablemente se puedan evaluar fenotipos novedosos, tales como parámetros sanguíneos o metabólicos. En el otro extremo, su utilidad en el mejoramiento de variables de producción que son medidas en forma rutinaria, dependerá de una serie de factores, entre ellos la factibilidad de integrar los marcadores a la evaluación cuantitativa y el beneficio marginal de su aplicación.

El avance de las metodologías genómicas ha sido vertiginoso y ha sido difícil seguirlos y a su vez transmitirlos al sector productivo. Sólo como ejemplo, puede citarse el advenimiento de la secuenciación de "última generación" en relación a la secuenciación capilar más convencional. Cuando muchos laboratorios habían logrado acceder a un secuenciador capilar, esta tecnología ya pasaba a ser de segunda línea. Otro indicador relevante es la tendencia en los costos de los proyectos de secuenciación de genomas. Es



esperable un número cada vez mayor de marcadores evaluados, a gran escala y con costos progresivamente menores.

**Tabla 5. Costos en dólares de secuenciación el ADN.**

Fecha	El costo por Mb de secuencia de ADN	Costo por Genoma
Septiembre-2001	\$ 5,292.39	\$ 95.263.072
De marzo de 2002	\$ 3,898.64	\$ 70.175.437
Septiembre-2002	\$ 3,413.80	\$ 61.448.422
De marzo de 2003	\$ 2,986.20	\$ 53.751.684
Octubre-2003	\$ 2,230.98	\$ 40.157.554
Enero-2004	\$ 1,598.91	\$ 28.780.376
Abril-2004	\$ 1,135.70	\$ 20.442.576
Julio-2004	\$ 1,107.46	\$ 19.934.346
Octubre-2004	\$ 1,028.85	\$ 18.519.312
Enero de 2005	\$ 974.16	\$ 17.534.970
Abril-2005	\$ 897.76	\$ 16.159.699
Julio-2005	\$ 898.90	\$ 16.180.224
Octubre-2005	\$ 766.73	\$ 13.801.124
Enero-2006	\$ 699.20	\$ 12.585.659
Abril-2006	\$ 651.81	\$ 11.732.535
Julio-2006	\$ 636.41	\$ 11.455.315
Octubre-2006	\$ 581.92	\$ 10.474.556
Enero-2007	\$ 522.71	\$ 9.408.739
Abril-2007	\$ 502.61	\$ 9.047.003
Julio-2007	\$ 495.96	\$ 8.927.342
Octubre-2007	\$ 397.09	\$ 7.147.571
Enero-2008	\$ 102.13	\$ 3.063.820
Abril-2008	\$ 15.03	\$ 1.352.982
Julio-2008	\$ 8.36	\$ 752.080
Octubre-2008	\$ 3.81	\$ 342.502
Enero-2009	\$ 2.59	\$ 232.735
Abril-2009	\$ 1.72	\$ 154.714
Julio-2009	\$ 1.20	\$ 108.065
Octubre-2009	\$ 0.78	\$ 70.333
Enero-2010	\$ 0.52	\$ 46.774
Abril-2010	\$ 0.35	\$ 31.512
Julio-2010	\$ 0.35	\$ 31.125
Octubre-2010	\$ 0.32	\$ 29.092
Enero-2011	\$ 0.23	\$ 20.963
Abril-2011	\$ 0.19	\$ 16.712
Julio-2011	\$ 0.12	\$ 10.497
Ene-2012 (EST)	\$ 0,09	\$ 7.950

Los paneles de marcadores deben “entrenarse” en relación a información fenotípica de calidad, para cuantificar los efectos de los mismos. No ha habido hasta el momento mucho interés por desarrollar estas poblaciones de referencia en el país, excepto en pequeña escala. Se espera que el mayor conocimiento del genoma bovino permita, entre otros objetivos, establecer con más precisión la transmisión genética de padre a hijo (por ejemplo en el caso de hermanos enteros), caracterizar y aprovechar mejor la variabilidad no aditiva, comprender mejor efectos múltiples del mismo gen (pleiotropía) y depender menos de la integridad de la genealogía. También pueden surgir nuevas estrategias a partir de la comprensión de procesos genéticos sofisticados que fueron descubiertos en fecha relativamente reciente, como la epigenómica o la regulación por microRNAs.