

Aplicaciones prácticas de las técnicas de ADN en ganadería

▼ A. BARROSO, J. CAÑÓN, Y. CARRETERO, M. CHECA, S. DUNNER, J.P. GUTIERREZ, L. ROYO. (1)

Antes de que se conociese la estructura del ADN, se creía que los genes estaban dispuestos unos detrás de otros como las cuentas de un rosario. Así ocurre, en efecto, en el genoma de los Procariotas, en los cuales no existe ADN no codificante. En los Eucariotas, sin embargo, las secuencias de ADN no codificante constituyen más del 90% del genoma y aunque la mayor parte no tiene función conocida, suelen presentar un polimorfismo elevado en el seno de una población.

Precisamente, gran parte de la tecnología que viene desarrollándose durante los últimos años en torno al ADN se fundamenta en la existencia de variabilidad genética, esto es, de diferencias entre individuos a nivel de su molécula de ADN.

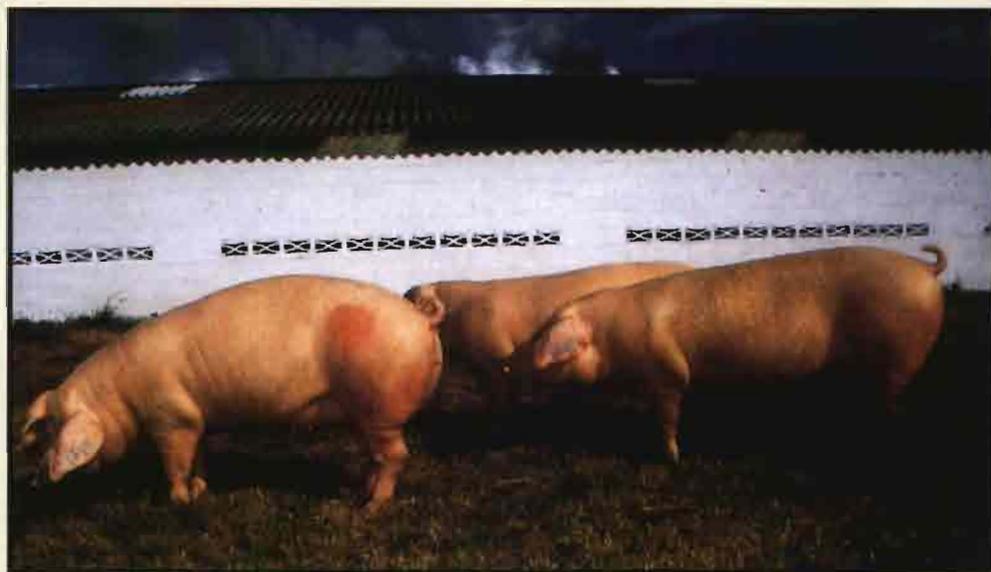
Para apreciar dicha variabilidad se recurre a una serie de instrumentos, conocidos como marcadores genéticos. Se entiende por marcador genético cualquier herramienta molecular que cumpla estas dos condiciones básicas: que sea polimórfico (es decir, que detecte diferencias a cualquier nivel, sean familias, géneros, especies o individuos) y que se herede mendelianamente (Edwards y Caskey, 1991).

Algunos marcadores genéticos se basan en el polimorfismo del producto del gen o de los genes, tales como los caracteres fenotípicos, los grupos sanguíneos y los marcadores proteicos. Sin embargo, en los últimos años se tienden a utilizar otros marcadores genéticos que revelan el polimorfismo directamente a nivel de la secuencia nucleotídica del ADN, y que permite por tanto obtener una "huella genética" individual para cada uno de los miembros de una población, que se conoce con el nombre de "DNA fingerprinting".

Tipos de marcadores

Los marcadores moleculares más utilizados, por orden cronológico de aparición son los siguientes:

RFLPs (Restriction Fragment Length



Los marcadores genéticos son útiles en el establecimiento de relaciones de filiación correctas.

Polymorphisms, Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción). Dos moléculas de ADN distintas pueden diferir en el número de lugares diana para una enzima de restricción determinada (Brown y Simpson, 1981). Estas diferencias se traducen en un polimorfismo cuando se separan por electroforesis. Esta técnica también se asocia a la hibridación.

RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA, Fragmentos de ADN de Longitud Polimórfica Amplificados al Azar). Los RAPDs consisten en amplificar por medio de la PCR una muestra de ADN problema utilizando para ello un "oligonucleótido cebador" de secuencia al azar y de pequeño tamaño con una baja temperatura de acoplamiento, lo que permite una menor especificidad de la reacción de amplificación y así conseguir un alto número de fragmentos anónimos en cualquier genoma (Williams y col., 1990; Welsh y McClelland, 1991).

VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats, Repeticiones en Tándem de Número Variable). Se trata de ADN no codificante cuya estructura responde a secuencias de nucleótidos repetidos en tándem con una unidad de repetición que varía entre dos y varios miles de pares de bases, y que pueden alcanzar una longitud total de hasta 100×10^6 pares de bases. En función de la longitud de repetición y

el tamaño de la estructura, estas secuencias se dividen en tres grandes clases (Tautz, 1993): ADN satélite, minisatélites y microsatélites.

Técnicas moleculares

Las técnicas más comúnmente usadas en Genética Molecular se pueden agrupar en tres grandes grupos, a saber: Hibridación, Amplificación y Clonado y Secuenciación.

La Hibridación es una de las metodologías más eficientes para estudiar la diversidad genética tanto en plantas como en animales. En primer lugar, hay que digerir el ADN genómico con alguna de las enzimas de restricción bacterianas que cortan el ADN en secuencias específicas (dianas de restricción), normalmente de 4 a 6 pares de bases. Posteriormente, los fragmentos de ADN genómico se separan según su longitud mediante electroforesis en un gel de agarosa; entonces, el patrón de fragmentos de restricción es transferido del gel a una membrana de nitrocelulosa o de nylon. La visualización se realiza por incubación de la membrana en una solución con una sonda de ADN marcada radiactiva (^{32}P o algún otro isótopo) o enzimáticamente (por medio de un anticuerpo ligado a una sustancia fluorescente); así, bajo condicio-

(1) Laboratorio de Genética. Facultad de Veterinaria. 28040 Madrid. Tfno.: (91) 394 3765; Fax: (91) 394 3772; E-mail: dunner@eucmax.sim.ucm.es.



CRINA®

Líder en aceites esenciales y extractos de especias

Los productos CRINA son combinaciones específicas de aceites esenciales. Su uso como mejorantes de los rendimientos en alimentación animal está creciendo rápidamente alrededor del mundo. CRINA es la elección en la industria de la fabricación de pienso.

- **Probada eficacia**
- **Ingredientes de calidad alimentaria humana**
- **Excelente estabilidad**

LA ELECCIÓN NATURAL

¡Contacte con nosotros para más información!

CRINA S.A.,
Chemin de la Combe 15, B.P. 510
CH-1196 Gland, Suiza
Tel. +41-22 364 32 30
Fax +41-22 364 28 17



Distribuido por:
Akzo Nobel Chemicals S.A.,
Autovia de Castelldefels km. 4,65
08820 El Prat del Llobregat (Barcelona)
Tel. 93-478 44 11
Fax 93-478 07 34

CRINA es una compañía líder en nutrición animal fundada en 1960. Desde abril de 1995 es miembro del grupo Akzo Nobel.



nes de temperatura y concentración salina adecuadas, la sonda se une -hibrida- a fragmentos de ADN que tienen una secuencia nucleotídica complementaria. Finalmente, todo ello se puede visualizar mediante autorradiografía sobre películas de rayos X, en el caso de que usemos radiactividad, o por medio de una reacción coloreada (Buitkamp y col., 1991).

La técnica de Amplificación es con mucho la más usada en la actualidad, desde el descubrimiento en 1986 de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por Kary B. Mullis y colaboradores; consiste en el aumento del número de copias de un fragmento determinado de ADN, y que delimitamos por medio de unos oligonucleótidos cebadores o primers. Básicamente, en ella se pueden distinguir tres fases: una primera de desnaturalización, en la que el ADN se somete a una elevada temperatura para disociar la doble cadena; una segunda de acoplamiento, en la que se permite a el/los cebador/es unirse al ADN monocatenario; y una tercera de extensión, que realiza la ADN polimerasa a partir de los cebadores.

El Clonado consiste en obtener un elevado número de copias de un cierto fragmento, que se introduce por medio de un vector dentro de una estirpe bacteriana o de una levadura y ésta se hace crecer en un medio de cultivo adecuado. El clonado nos permite la Secuenciación de dicho fragmento, al que llamamos inserto (Sigurdardóttir y col., 1991). Esta es la técnica que más información nos proporciona, pues llegamos al conocimiento de la composición nucleotídica exacta del ADN bajo estudio, aunque desde luego es también la más cara y onerosa.

¿Qué técnica debemos utilizar?

Muchos de los objetivos de investigación en Biología Molecular se pueden abordar desde muy distintos puntos de vista, con lo cual se hace necesario tener en cuenta una serie de criterios a la hora de decantarse por una u otra metodología.

- En primer lugar, la cantidad de ADN que precisamos; en este sentido, la hibridación requiere en torno a los 10 microg., mientras que, en el otro extremo, la PCR puede hacerse partiendo de una sola molécula de ADN.

- En segundo término, el grado de información que deseamos obtener de la muestra a analizar o, lo que es lo mismo, el poder analítico del método: obviamente, la secuenciación es el más fino de todos ellos.

- Finalmente, no son despreciables los costes económicos, humanos y laboratoriales, así como la amplitud de aplicaciones: veremos en el capítulo siguiente que la



La amplificación es la técnica más usada.

PCR es la más prometedora en este sentido.

Aplicaciones de las técnicas moleculares

En los últimos 10 años, la Genética Molecular ha sido ampliamente utilizada en muy diversas áreas de la Biología. Y ha resultado ser una poderosa herramienta para analizar la variabilidad genética en diferentes especies, tanto de animales como de plantas. Entre sus principales aplicaciones, destacamos las siguientes:

- * Control de paternidad o control de filiación.
- * Elaboración de mapas genómicos.
- * Búsqueda de QTLs (Quantitative Trait Loci, Loci asociados a Caracteres Cuantitativos).
- * Selección asistida por marcadores (M.A.S.).
- * Mantenimiento de la variabilidad genética.
- * Introgresión de genes.
- * Estudios taxonómicos.
- * Aplicaciones en Medicina (diagnóstico de enfermedades, diagnósticos prenatales) y Veterinaria Clínica.
- * Estudios forenses.
- * Sexaje de embriones.
- * Tipado del ADN de especies desaparecidas.

Control de filiación

Una de las utilidades más importantes de los marcadores genéticos es el establecimiento de relaciones de filiación correctas, tanto para garantizar la veracidad de

las genealogías —especialmente las de los animales de mayor valor genético— como para un diseño adecuado de apareamientos en programas de minimización de consanguinidad.

Clásicamente, toda esta labor se realizaba por medio del marcaje de los animales y su registro en los libros genealógicos; sin embargo, este método muchas veces inducía a error, más aún cuando los animales no se encontraban estabulados permanentemente.

Con el tiempo apareció una nueva forma de control basada en el análisis de los grupos sanguíneos, que comprende estudios del grupo sanguíneo y del polimorfismo bioquímico del suero en mayor o menor medida. Los grupos sanguíneos continúan siendo la prueba de referencia a la hora de establecer un diagnóstico de paternidad correcto, pero tienen claras desventajas si los comparamos con los marcadores genéticos:

- Necesidad de mantener un panel de animales vivos en el laboratorio para la inmunización y absorción de los anticuerpos monoclonales.

- En muchos casos son necesarios varios años para la obtención del anticuerpo deseado para un antígeno específico.

- Y sobre todo, el único tejido de partida es la sangre, con el fin de testar los animales en las reacciones hemolíticas, y ésta ha de ser fresca. En cambio, la Genética Molecular puede partir de cualquier tipo de tejido que tenga células nucleadas, no necesariamente fresco.

Todas estas razones condujeron a la aplicación de la Genética Molecular a este menester. La primera técnica utilizada fueron los RFLPs, actualmente en desuso por los problemas que conlleva (patrones muy complicados, cierta subjetividad en la interpretación, coste, difícil automatización y necesidad de una cantidad de ADN grande —en torno a los 10 µg.— y en buen estado) y sobre todo por la irrupción de los microsatélites.

Los Microsatélites consisten en repeticiones en tándem de unidades de 2 a 7 pares de bases. Su elevado polimorfismo y ubicuidad dentro del genoma los convierte en los marcadores genéticos de elección para un sinnúmero de propósitos, entre los cuales está el control de filiación. Además, por estar basado en la PCR, la cantidad de ADN de partida es mínima y funcionan bien aunque éste no esté en óptimas condiciones. Son fácilmente identificables y comparables, ya que cada banda se puede definir por un número o letra, y así toda la información obtenida ser tratada por medio de sistemas informáticos. Los resultados son transferibles de un laboratorio a otro, el grado de mutación es bajo (10^{-4}) y por tanto es improbable llegar a diagnósticos de paternidad erróneos; final-

EXAL[®]



Los animales ganan.



Vd. Ahorra

TOLSA, S.A.

Núñez de Balboa, 51, 4.º 28001 MADRID
Teléfono 322 01 00 Telefax 322 01 01



mente, su coste es muy inferior al de cualquiera de los métodos anteriores.

Cualquier alelo que aparezca en un descendiente, debe existir al menos en uno de los parentales. Dicho de otra manera, un padre que no tenga ningún alelo en común con el supuesto hijo, queda descartado: a esto se le conoce como EXCLUSIÓN DE PATERNIDAD, que es categórica, en el sentido de que una incompatibilidad descarta totalmente la paternidad. En cambio, el concepto de ASIGNACIÓN DE PATERNIDAD es probabilístico, pues el hecho de tener una constitución alélica compatible con el individuo en cuestión sólo significa que puede ser su padre, no que necesariamente lo sea.

el valor máximo de la probabilidad de exclusión para ese locus mediante la expresión:

$$PE_{\max} = 1 - \frac{2 \cdot n^3 + n^2 - 5 \cdot n + 3}{n^4}$$

La probabilidad de exclusión aumenta con el número de loci que se utiliza puesto que es suficiente excluir con uno de ellos. La probabilidad de exclusión total cuando se consideran i loci es:

$$PE_{\text{total}} = 1 - \prod (1 - PE_i)$$

Es importante señalar que, cuando hablamos más arriba de la "huella genética" o técnicas de fingerprinting con sondas multilocus, el problema que se ha tratado en muchas ocasiones difiere de este comentado ahora. Es diferente asignar una paternidad que excluir una paternidad. Mientras que la exclusión es una variable categórica, la asignación es probabilística. La asignación de paternidad se puede hacer utilizando el cálculo de la probabilidad de que un individuo sea el verdadero padre, de tal forma que

cuando dicha probabilidad supere un determinado umbral, por ejemplo el 0,99 ó 99 %, asignamos a ese padre como el verdadero. Esta probabilidad se suele denominar (en términos de estadística bayesiana) probabilidad posterior de paternidad (PP) que viene expresada en la siguiente fórmula:

$$PP = \frac{IP \cdot Pa}{(1 - Pa) + IP \cdot Pa}$$

siendo:

PP la probabilidad posterior de paternidad del individuo problema (de que sea el padre)

IP un índice de paternidad que se calcula como: $1/(1 - PE)$, donde PE es la probabilidad de exclusión

Pa es la probabilidad a priori de que el individuo sea el padre

Con cierta frecuencia se ha argumentado en favor de utilizar valores de 1/2 para ambas probabilidades, lo que reduce

la expresión anterior a la conocida ecuación de Essen-Möller:

$$\frac{IP}{IP + 1}$$

Elaboración de mapas genómicos

Cuando se trata de realizar un mapa genómico de una especie, hay tres conceptos implicados: el mapa genético (es decir, el descubrimiento y análisis de marcadores -básicamente microsatélites- repartidos uniformemente a lo largo del genoma), paso previo para el establecimiento del mapa físico (que consiste en la definición de grupos de sintenia y en la asignación de los genes a sus respectivos cromosomas, básicamente por hibridación in situ); y el mapa comparativo, en el que se confrontan los conocimientos sobre los mapas de las diferentes especies domésticas: se suelen tomar como referencias los del hombre y el ratón, que son los más desarrollados.

En las especies domésticas, están todavía desarrollándose los mapas genéticos, por lo que no ha lugar referirse a los mapas físicos.

El objetivo de los mapas genéticos es definir, a lo largo del genoma de la especie estudiada, un cierto número de marcadores separados entre sí por unos 20 centiMorgan (cM.), esto es, una distancia suficientemente pequeña como para que exista un gran desequilibrio de ligamiento (como mucho, 10 cM., o sea, un 10% de posibilidades de recombinación) entre un gen en concreto y su marcador más cercano. Dos clases de genes forman la base para la construcción de mapas genéticos en las especies domésticas: los loci de tipo I, que representan secuencias codificantes altamente conservadas evolutivamente y muy útiles, por tanto, para estrategias de mapeo comparativo, y en los que el polimorfismo no es esencial; y los loci de tipo II, que son segmentos de ADN hipervariables -sobre todo, microsatélites-, anónimos -no codifican para ningún producto génico-, muy polimórficos y normalmente específicos de especies íntimamente relacionadas.

El interés suscitado en los últimos años por la cartografía genética se explica por el gran número de aplicaciones que de los mapas se derivan, como son: mejora de los métodos de identificación de las filiaciones y de los individuos, una evaluación precoz de los genotipos en loci próximos a genes mayores todavía no clonados, la puesta en evidencia de las regiones genómicas responsables de la variabilidad de los caracteres cuantitativos (QTLs) o una profundización en la diversidad interracial.

El hecho de que sean los microsatélites



Tan sólo unos pocos microsatélites han sido caracterizados en los caballos.

El valor de la probabilidad de exclusión va a depender tanto del número de microsatélites empleados, como del número de alelos que muestren y sus frecuencias alélicas respectivas. Aunque depende de la población concreta dónde se pretenda llevar a cabo el control de filiación, la utilización de un número entre 8 y 10 microsatélites con 6-8 alelos/microsatélite permite trabajar con probabilidades de exclusión por encima del 99%, es decir, de cada 100 falsos padres nosotros detectaríamos más de 99 de ellos y tan sólo para menos de 1 padre no podríamos descartar su paternidad. En el caso de trabajar con marcadores codominantes, como es el caso de los microsatélites, la probabilidad de exclusión para un locus cuando se conoce uno de los padres viene dada por la expresión:

$$PE = \sum_i p_i (1 - p_i)^2 - 1/2 \sum_i \sum_j p_i p_j$$

Cuando todos los alelos (n) de un locus tienen igual frecuencia se puede obtener

los marcadores de elección se debe a tres propiedades fundamentales que éstos poseen: elevado polimorfismo (existe una gran variabilidad individual en el número de repeticiones $(TG)_n$ para un locus dado); están uniformemente repartidos por todo el genoma (el ADN de la mayor parte de los animales domésticos contiene del orden de 60.000 de estas secuencias); y son perfectamente automatizables.

En el momento actual, dos son los mapas que más impulso están recibiendo entre las especies domésticas, el del cerdo y el de bovino. Para ellos, así como para ovejas y pollos, existe ya un mapa de ligamiento de 20 cM., fruto del esfuerzo combinado de varios grupos de todo el mundo.

Se han construido mapas de ligamiento genético del genoma porcino basados en marcadores genéticos del tipo I y tipo II. El primer mapa, denominado USDA, contiene principalmente marcadores tipo II, mientras que otros dos mapas, el Sueco y Europeo (denominado PigMaP), contienen ambos tipos de marcadores, I y II. En el momento actual, son nueve los QTLs definidos en esta especie, de los cuales a siete (Gen del Halotano, ESR, RN, K88, SLA, Transferrina y uno desconocido que influye en la proporción de grasa dorsal) ya se les ha asignado posición en el cromosoma correspondiente.

Por lo que se refiere a la especie equina, en octubre de 1995 tuvo lugar un importante paso para elaborar un mapa genético: el First Gene Mapping Workshop for the Horse, en Lexington, que se concretó en que durante los próximos cinco años 25 laboratorios de todo el mundo van a trabajar en la confección del mapa genético del caballo. De forma inicial, se pretenden caracterizar 300 marcadores (de nuevo, microsatélites). Hasta ahora, tan sólo unos pocos microsatélites han sido caracterizados en los caballos.

En cuanto a la especie canina, desde 1993 se ha puesto en marcha un proyecto de investigación llamado DogMap, iniciativa que se complementa con otra desarrollada simultáneamente por laboratorios norteamericanos, el Dog Genome Project. En el segundo congreso mundial del Dog-Map, en el que participaron unos 60 laboratorios de 17 países, se hizo balance de los resultados hasta ahora obtenidos y éstos se cifran en el conocimiento de más de 200 microsatélites de polimorfismo constatado, de los cuales más de 100 están ya disponibles para la realización de control de paternidad y de identificación individual.

En cuanto al vacuno, en marzo de 1994 estaban descritos un total de 202 marcadores, 144 de ellos microsatélites. Estos marcadores cubren alrededor del 90% de la longitud esperada del genoma bovino. De los 29 pares de autosomas, 24 tienen ya grupos de ligamiento asignados a ellos y

lo mismo los dos cromosomas sexuales; además, hay tres grupos de ligamiento con asignación sinténica y uno más físicamente no asignado.

Detección de QTLs

Los QTLs (Quantitative trait loci, loci que controlan caracteres cuantitativos) son porciones del genoma que se heredan de forma Mendeliana, y que son responsables de un porcentaje más o menos importante de la variabilidad de caracteres productivos.

La existencia de QTLs y su control puede tener gran utilidad, por ejemplo, cuando el carácter cuantitativo que controlan sólo puede medirse en uno de los sexos (producción de leche, prolificidad, etc...), ya que permitiría disponer de una información importante del genotipo del animal sin esperar a poseer datos de sus parientes. Otras veces, el carácter se mide en el animal muerto (datos de canal), de manera que disponer del genotipo para el QTL en el animal vivo, permitiría seleccionar los reproductores con información propia y reducir el intervalo generacional.

La dificultad en la obtención de datos justifica por tanto la utilidad de los QTLs, pero también dificultan la localización de las porciones del genoma donde se encuentran, al no poder disponer de datos del fenotipo del propio animal. Además, la parte que controla el resto del carácter es normalmente de tipo poligénico.

Sin embargo, es posible disponer de información de porciones del genoma relativamente cercanas al QTL que, por tanto, suelen acompañar a éste y pueden ser utilizados como lo que se denomina marcadores del mismo.

La identificación y cartografiado de tales porciones del genoma, bien QTLs o bien sus marcadores, puede ser de gran valor por varias razones:

* En primer lugar, el hecho de conocer la acción de genes individuales permite la construcción de modelos más reales que explican la variabilidad de los caracteres. Ello conllevaría el desarrollo de métodos más eficaces para la evaluación genética de reproductores con las correspondientes

ventajas en la selección.

* En segundo lugar, la información de marcadores puede ser utilizada directamente para mejorar la predicción del valor de mejora y, así, la selección asistida por marcadores puede ser un método eficaz para introducir unos pocos genes de valor de una raza en otra, o bien para mejorar las respuestas a la selección dentro de una raza.

* En tercer lugar, el mapeo de un QTL permite el conocimiento de la ruta necesaria para el eventual clonado de un locus.

El análisis de hipotéticos marcadores de un QTL puede llevarse a cabo rastreando marcadores ligados al QTL por proximidad, o bien, partiendo de la hipótesis de que el QTL se encuentra situado entre dos



En vacuno, en 1994 estaban reconocidos un total de 202 marcadores.

marcadores, rastreando marcadores flanqueantes del QTL.

En cualquier caso, la búsqueda de QTLs mediante marcadores ligados a los mismos, debe realizarse en varias etapas:

- Evidenciar la existencia de un QTL ligado al marcador, es decir, detectar alguna porción del genoma que influye en el carácter de una forma significativa.

- Estimar la tasa de recombinación entre el QTL y el marcador, o lo que es lo mismo, medir la distancia entre ambos o su grado de proximidad. ¿Es esta distancia igual en ambos sexos?

- Estimar los efectos de aditividad y dominancia tanto en el QTL como en el marcador.

La investigación precisa de dos fuentes de información: por un lado, el genotipado para los marcadores de algunos o de todos los individuos, y, por otro, los datos productivos igualmente de algunos o todos los individuos. Los modelos de segregación planteados dependerán del origen y diseño

de ambas bases de datos. Así, si se utilizan datos de campo es frecuente disponer de un gran número de registros de datos productivos aunque sólo de unos pocos se conoce el genotipo del marcador. Cuando los datos disponibles proceden de un experimento diseñado al efecto, es corriente disponer del genotipo de todos o casi todos los individuos, pero el número de registros suele ser escaso.

En función de la estructura de las bases de datos se describe el modelo de segregación que corresponde. Para ello se tiene en cuenta, por ejemplo, que un homocigoto dará siempre el mismo tipo de alelo a su descendencia, o que el cruce de dos heterocigotos dará lugar a homocigotos y heterocigotos en la misma proporción, etc. Una vez establecido el modelo se pueden estudiar, mediante técnicas estadísticas, todos los puntos citados arriba.

Los resultados que se obtengan dependerán de diversos factores entre los que destacan el porcentaje del carácter que es determinado por el QTL, la distancia entre el QTL y el marcador y el número de datos disponibles. Aunque ya existen marcadores de algunos QTLs, los estudios realizados mediante simulación muestran la dificultad de obtener resultados satisfactorios en este campo.

Para un gran número de variables productivas que llevan muchas generaciones sometidas a procesos de selección, es difícil pensar en la existencia de QTLs que estén explicando gran parte de la variabilidad del carácter ya que es lógico pensar que el alelo beneficioso haya sido fijado. Sin embargo, puede resultar muy interesante cuando se trata de la introducción de un gen nuevo de una población a otra (lo que se conoce como introgresión génica). Por otro lado, el empleo de marcadores en enfermedades hereditarias permitiría detectar a los animales portadores.

Selección por marcadores

La evaluación BLUP consiste en la predicción del valor de mejora de un animal utilizando los datos productivos del animal y/o de sus parientes. La información de individuos emparentados se combina mediante la relación genética aditiva entre ambos, es decir, la proporción de genes compartidos por descendencia entre ambos.

La detección de marcadores (nuevamente, los microsatélites son los de elección) permite identificar diferencias entre los genotipos de distintos individuos en ciertas localizaciones del genoma. Estas localizaciones son llamadas loci marcadores, los cuáles no son normalmente QTLs, pero pueden estar ligados a los mismos.

El empleo de la información de marcadores permite acelerar el progreso gené-



En pollos existe un mapa de ligamientos.

tico, al incrementar la precisión de las evaluaciones, reducir el intervalo generacional e incrementar los diferenciales de selección.

Para poder utilizar la información de marcadores, la forma de combinar la información de parientes varía ligeramente de la empleada normalmente mediante la metodología BLUP. Así, en lugar de incorporar en los modelos de evaluación la relación genética aditiva entre animales, se incorpora la relación gamética entre animales. La extensión a modelos que permiten incorporar la información de múltiples marcadores del mismo QTL es también posible aunque los primeros resultados prácticos deberán esperar a que se disponga de más información de marcadores.

Variabilidad genética

La conservación y mantenimiento de niveles adecuados de variabilidad genética dentro de las poblaciones de animales domésticos es un factor muy relevante en la actualidad, no sólo para la conservación de los recursos genéticos, sino para asegurarse un lógico y perfecto control de las poblaciones ganaderas tanto para su mantenimiento como para su selección, explotación y mejora (Chevalet, 1992).

En este sentido está siendo muy discutido el posible uso de los marcadores genéticos en poblaciones de censo reducido y limitado para contrarrestar el efecto de la deriva genética sobre las frecuencias alélicas de los genes de interés y la consecuente reducción de la variabilidad genética.

Esta variabilidad genética, en ausencia de marcadores genéticos, es estimada mediante el análisis estadístico de la varianza de caracteres cuantitativos. Con-

trolar esta variabilidad consiste en estimar, al final de un determinado número de generaciones, las variaciones en los componentes de la varianza, especialmente de la varianza genética aditiva, comparando los resultados obtenidos entre poblaciones sometidas o no a selección.

En una población sometida a un programa de conservación (y normalmente de censo reducido) en la que una línea control se deja sometida a la acción de la selección natural únicamente, los métodos para calcular el progreso de la consanguinidad permiten predecir la evolución de los componentes genéticos de la varianza, según la demografía y los cruzamientos establecidos en la población. Los marcadores genéticos podrían ser introducidos para controlar la deriva y para establecer programas de gestión y manejo genético de las poblaciones bajo estas circunstancias, buscando mantener la variabilidad genética y las frecuencias alélicas de la población a sus niveles iniciales (o a los máximos niveles posibles); para ello, hay que lograr mantener simultáneamente varios alelos en loci independientes y favorecer la reproducción de individuos portadores de alelos raros. Pero surgen dos problemas:

- Es necesario, al hacer cualquier tipo de selección, ejercer una presión de selección sobre la población, lo que induce sistemáticamente una limitación en el número de reproductores y, por tanto, un incremento adicional de la deriva.

- Sería necesario evaluar el impacto de una selección realizada en algunos marcadores sobre la estructura global del genoma.

Por tanto, si disponemos de un conjunto de marcadores uniformemente distribuidos, deberíamos hacernos dos preguntas: ¿serían eficientes en su utilización, según su densidad y la intensidad de selección aplicada, para ralentizar el proceso de deriva genética inevitable en una población de censo limitado? ¿se puede ejercer un control sobre el conjunto del genoma a partir de un número restringido de marcadores?

Una población de censo limitado no sometida a selección sufre una reducción en su heterocigosis debida a la deriva y en cada generación la población se define por su tasa media de heterocigosis en los loci marcadores y por su tasa media de heterocigosis global sobre el conjunto del genoma.

Para realizar este control en poblaciones de tamaño reducido se establece un criterio de selección basado en un índice que favorece el mantenimiento de la heterocigosis en el locus marcador.

Los resultados que se obtienen tras aplicar la selección basada en marcadores genéticos para lograr el mantenimiento de la variabilidad genética muestran una clara influencia de la densidad de los marcado-

SUIVET

CARAZOLOL



Y TODO SEGUIRA EN CALMA



SUIVET (β -bloqueante específico para cerdos) **Solución inyectable**

COMPOSICION:

Carazolol... 0,5 mg
Excipiente c.s.p... 1 ml.

INDICACIONES:

Prevención y tratamiento de los trastornos cardior-circulatorios y metabólicos que las situaciones de estrés desencadenan en la especie porcina, por ejemplo en transportes, cambios de estabulación y en partos.

ESPECIES DE DESTINO:

Porcino.

VIA DE ADMINISTRACION:

Vía intramuscular profunda.

DOSIFICACION Y MODO DE EMPLEO:

PORCINO ADULTO: 0,2 ml/10 kg p.v.

LECHONES HASTA 20 kg: 1 ml/animal.

El efecto del preparado se mantiene unas 8 - 12 horas, pudiéndose aplicar nuevamente una vez transcurrido este plazo.

INCOMPATIBILIDADES E INTERACCIONES:

Con narcóticos, anestésicos, broncodilatadores y localícticos.

EFFECTOS SECUNDARIOS:

No se han descrito.

PERIODO DE SUPRESION:

Carne: 2 horas.

Mantener fuera del alcance de los niños.

Prescripción veterinaria

Nº REGISTRO: 412/0815 ESP

Ctra. Sant Hipòlit, km. 71
08518 GURB-VIC (Barcelona) SPAIN
Apartado de Correos 79 VIC



Tel. (93) 886 01 00 Fax (93) 889 01 31



Los microsatélites han sido propuestos para las técnicas de sexaje.

res utilizados sobre la eficacia del método (Chevalet 1992).

De acuerdo con este autor, en poblaciones de censo reducido (menos de 100 reproductores eficaces), un número de marcadores bajo pero uniformemente repartido (3 marcadores en cada 100cM.) permite unas mejoras sensibles en el mantenimiento de la heterocigosis sobre el conjunto del genoma con una intensidad de selección débil.

Así, con 2 marcadores por cromosoma la disminución de la deriva sobre el conjunto global del genoma es pequeña y además una selección intensa produce un aumento rápido de la deriva dando lugar a valores inferiores de variabilidad a los obtenidos sin selección.

Además la respuesta observada de los marcadores es muy elevada incluso con un elevado número de marcadores seleccionados simultáneamente.

Luego se observan valores óptimos para bajas intensidades de selección (50-80%), siendo el óptimo el 85%, salvo para poblaciones de muy pequeño tamaño (25 individuos).

La eficacia relativa es tanto mejor cuanto menor sea el efectivo de la población, pero cuando se incrementa el tamaño de la población el método es más eficaz si se baja la intensidad de selección.

La eficacia de esta técnica sigue discutiéndose y cabe destacar, como hecho más importante, la necesidad de determinar la densidad de marcadores necesaria para lograr una buena selección, combinando progresivamente distintos tipos de marcadores.

Introgresión génica asistida por marcadores

La introgresión génica consiste en incluir

en una población determinada un gen que se encuentra presente en una población distinta. La introgresión tiene sentido cuando la población que posee el gen de interés es menos productiva que aquella en la que se va a introducir.

El proceso clásico de introgresión se hacía a partir de retrocruzamiento entre una población F1 y la población más productiva, siendo el objetivo final la obtención en el menor tiempo

posible del mayor número de animales con el mayor porcentaje de genes de la población objetivo y homocigotos para el gen de interés. Este objetivo puede lograrse de manera más eficiente si se utilizan marcadores moleculares en el caso de que los genotipos a los que da lugar el gen de interés puedan ser identificados de manera inequívoca.

La utilización de marcadores del gen de interés puede resultar de gran eficacia cuando, por ejemplo, el carácter se mida en un sólo sexo, cuando se mida o aparezca a una edad avanzada del animal, cuando la medida del carácter suponga el sacrificio del animal, cuando el gen de interés, (por ejemplo, un gen con efecto grande o gen mayor) tenga penetrancia incompleta, es decir, las manifestaciones a las que da lugar dicho gen mayor no siempre aparecen en los individuos portadores de dicho gen.

La posibilidad de utilización de marcadores moleculares, tipo microsatélite por ejemplo, depende por un lado del grado de ligamiento entre el marcador y el gen de interés y, por otro, del grado de polimorfismo del marcador. Un nivel de ligamiento bajo supone una distancia entre marcador y gen suficiente como para que se produzcan recombinaciones entre ambos loci, lo que reduce la eficacia en la utilización de dichos marcadores. En cuanto al grado de polimorfismo, si éste es elevado aumenta la frecuencia de combinaciones de genotipos informativos, en general, aquellos que son dobles heterocigotos, es decir, que son heterocigotos para el marcador y para el gen de interés.

En el caso de que la distancia entre el marcador y el gen de interés permita una elevada tasa de recombinación entre ellos la utilización de este marcador debe entenderse como una primera aproximación en

la elección de los animales que se van a reproducir, siendo necesario complementar el criterio de selección con la información fenotípica que proporcionen aquellos caracteres más directamente influidos por el gen mayor.

Por último, es importante señalar que los marcadores moleculares podrían también ser utilizados para acelerar el proceso de incrementar la proporción de genes de la raza en la que hemos realizado la introgresión, de forma que este proceso de aceleración es más eficiente si se utilizan marcadores situados en el mismo cromosoma que el del gen de interés, para lo cual siempre será necesario disponer del mapa genético de la especie de que se trate.

Una aplicación posible de introgresión se puede considerar con el gen de la hipertrofia muscular en vacuno de carne. En nuestro Departamento hemos comprobado el ligamiento de una serie de marcadores moleculares tipo microsatélites con el gen responsable de la hipertrofia muscular. Este gen tiene un efecto pleiotrópico muy importante sobre una serie de características productivas que inciden en la rentabilidad de las explotaciones dedicadas al vacuno de aptitud carnicera. La influencia más llamativa es la que ejerce sobre el rendimiento a la canal y características de las mismas, de forma que la relación de carne respecto a hueso y grasa es mucho mayor en los animales portadores del gen de la hipertrofia muscular. Pero este gen tiene otras manifestaciones no tan deseadas, como las que afectan a la aptitud materna. El gen tiene un comportamiento parcialmente recesivo con respecto al alelo no mutante por lo que los heterocigotos para este locus están más próximos a los individuos corrientes. Por ello, puede resultar de gran interés práctico el poder determinar si un individuo es portador o no del gen mutante y así ofrecer la garantía de que, por un lado, los posibles sementales que se utilicen para cruzamiento industrial con otras razas bovinas sean portadores del gen de la hipertrofia muscular en homocigosis y, por otro, que animales que se utilicen para reposición en las ganaderías que no desean la cularización estén libres de dicho gen. Desde el punto de vista de una raza bovina de carne con una menor conformación carnicera podría resultar interesante el plantearse la introgresión del gen de la hipertrofia muscular de una manera controlada, desde el momento en que sean identificables todos los genotipos.

Aplicaciones en Medicina

Las técnicas de Biología Molecular representan una herramienta formidable de diagnóstico en medicina, pues permiten tener acceso a la información genética ana-

lizando los ácidos nucleicos. Estas han transformado el descubrimiento de las enfermedades hereditarias, la búsqueda de predisposiciones a ciertas enfermedades y la medicina legal. Pero su utilización se extiende también a las infecciones virales, bacterianas o parasitarias y a los cánceres, que en muchos casos son resultado de alteraciones genéticas.

Las primeras aplicaciones médicas de las técnicas de la biología molecular conciernen a las enfermedades hereditarias. El primer diagnóstico prenatal data de 1976 y fue realizado por W.Y Kan, en San Francisco: consistió en detectar una alfa-talasemia, una enfermedad hereditaria resultante de un defecto de síntesis de la hemoglobina. Posteriormente fue desarrollado un test de ADN basado en la PCR para detectar el defecto genético resultante de la deficiencia de sintasa monofosfato uridina, que es un desorden genético autosómico recesivo en vacuno Holstein.

Dentro del grupo de enfermedades infecciosas observadas en los animales domésticos, aquéllas producidas por hemoparásitos (Anaplasmosis, Babesiosis) tienen especial relevancia, y por ello durante los últimos años se han diseñado métodos diagnósticos basados en la hibridación específica de cadenas complementarias de ADN. La razón por la cual se ha escogido esta metodología estriba en que el ADN permanece sin cambios en todos los estadios evolutivos del ciclo biológico del parásito, independientemente de las variaciones ambientales, sea el hospedador vertebrado o invertebrado. Por el contrario, métodos basados en la detección de proteínas, lípidos o ARN están sujetos a la variación fenotípica, que puede verse afectada cualitativa y cuantitativamente por reorganizaciones moleculares y expresión de genes específicos del estadio evolutivo en que el parásito se encuentre.

En general, los métodos diagnósticos se basan en la hibridación de ácidos nucleicos. La técnica propicia las condiciones necesarias para que una sonda de ácido nucleico que tenga una secuencia específica caracterizada de una especie, cepa o aislamiento, hibride y forme un dúplex exclusivamente con los ácidos nucleicos que posean secuencias complementarias a la sonda. Si en la muestra a analizar no hay cadenas complementarias a la sonda, no habrá hibridación, y la conclusión será que el parásito no está presente.

Una característica de las enfermedades genéticas es que generalmente son estables unas pocas generaciones, durante las cuales podemos seguirlas por medio de análisis de ADN. Pero esto no se cumple para ciertas enfermedades causadas por mutaciones en microsatélites (concretamente, por expansiones de repeticiones trinucleotídicas): estas mutaciones son inestables y varían entre

diferentes miembros de una familia, entre hermanos, e incluso entre tejidos y células del mismo individuo. Son responsables del síndrome de X frágil, la distrofia miotónica y la atrofia muscular espinal y bulbar ligada a X o enfermedad de Kennedy, que son enfermedades típicas de la especie humana. Otros casos de esta clase de enfermedades son el defecto de la adherencia de los leucocitos, presente en el hombre y en el setter irlandés, o el Síndrome de granulocitopatía canina.

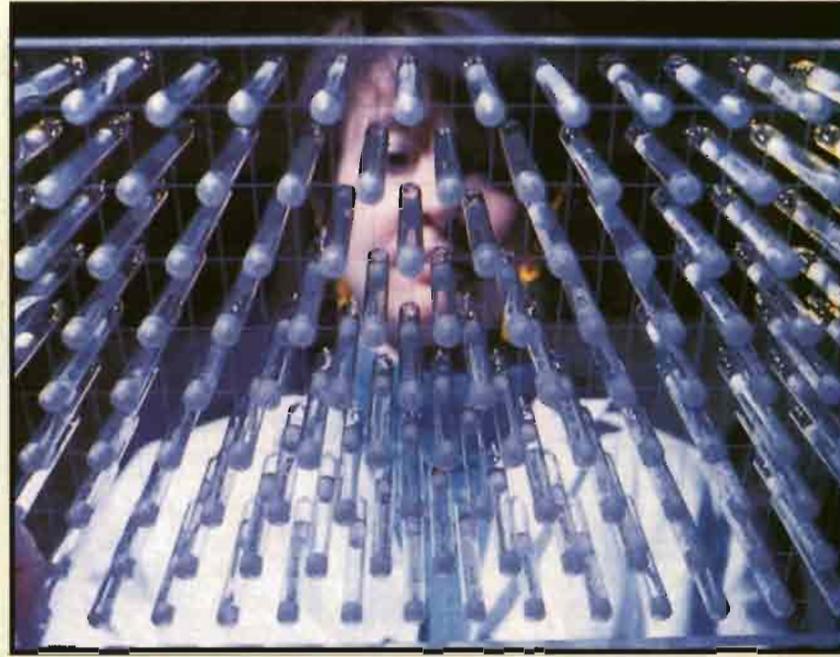
Como último ejemplo de enfermedad genética, destacaremos el BLAD, defecto autosómico recesivo que se da en el ganado Holstein. Una mutación en homocigosis del gen codificante para una glicoproteína de membrana (la CD₁₈), hace imposible el paso de los leucocitos de los vasos sanguíneos a los tejidos infectados. Estos animales sufren infecciones múltiples y mueren precozmente. Existe un test de detección de esta mutación, desarrollado en este estudio ha sido a partir de las publicaciones de Kehrl et al. (1990, 1992a y b), y validado sobre toros Holstein con status BLAD conocido.

Estudios forenses: las técnicas de Genética Molecular son válidas también para investigar casos de índole forense, de hecho se admiten como prueba legal para la resolución de un pleito.

Los microsatélites, una vez más, son el tipo de marcadores genéticos idóneos para la investigación de este tipo de problemas. El grado de discriminación es función tanto del número de marcadores usado como de las frecuencias alélicas encontradas; en este caso, el factor limitante fundamental es la cantidad de muestra disponible y su estado de conservación, pues de lo que se dispone normalmente es de sangre, semen o saliva.

Sexaje de embriones: Después de la integración de la inseminación artificial en algunas de las especies domésticas y, más recientemente en el caso del ganado vacuno, de la transferencia de embriones (MOET), el sexaje precoz presenta un interés considerable.

La técnica de la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) y el clonado de secuencias bovinas específicas del cromosoma Y, han permitido la puesta a punto



La información de los marcadores permite acelerar el progreso genético.

de métodos sensibles y rápidos para el sexaje de embriones bovinos en estadios embrionarios muy tempranos. Uno de ellos es la co-amplificación de un microsatélite específico de Y y de un microsatélite autosómico bovino. La amplificación del segundo (control interno), permite detectar la presencia efectiva de ADN bovino en las muestras, así como controlar la calidad de la reacción enzimática. La utilización simultánea de controles de ADN bovino masculino y femenino aporta una ganancia sustancial en la seguridad del diagnóstico. Por ello, los microsatélites han sido propuestos como candidatos para las técnicas de sexaje, ya que las estructuras repetitivas generalmente se prestan mejor para la amplificación por PCR. Como método subordinado a la amplificación por PCR, permite el sexaje partiendo de un pequeño número de células, condición indispensable para no comprometer la viabilidad del embrión. La sensibilidad así como la rapidez de estos métodos de sexaje utilizando la PCR han sustituido a las técnicas clásicas de hibridación, más largas y menos sensibles.

Tipificación genética de especies desaparecidas: combinando el uso de la PCR y de marcadores del tipo de los microsatélites es posible llegar a la identificación del ADN procedente de especies conservadas en museos (Arnheim et al., 1990; Smith & Patton 1991). Esto podría permitir un análisis detallado de especies extinguidas así como la comparación de poblaciones genéticas de especies actuales con otras del pasado. Este estudio es posible gracias a la posibilidad de obtener una buena reproducibilidad de los microsatélites a partir de pequeñas muestras e incluso de muestras muy degradadas, así como por su abundancia e hipervariabilidad a lo largo del genoma. ■