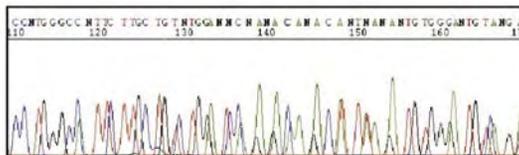
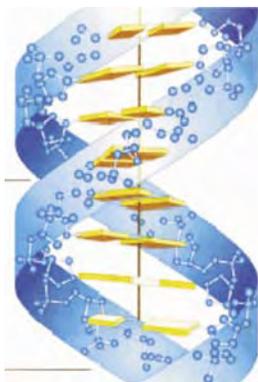


Biotecnología animal: aplicaciones prácticas del análisis de ADN



El ADN es una macromolécula con estructura de doble hélice, formada por cuatro tipos de nucleótidos diferenciados por sus bases nitrogenadas denominadas adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T), ordenados en una secuencia específica para cada organismo.

Esta secuencia puede considerarse como un código que:

- a) determina la información genética que se trasmite de generación en generación;
- b) contribuye a definir las características de dichos organismos.

Dentro de cada secuencia de ADN es posible identificar regiones que presentan alta variabilidad entre individuos de la misma especie (ó de una raza particular), por lo que pueden ser utilizadas como marcadores moleculares para identificar el aporte genético de cada reproductor a su descendencia mediante tipificación de ADN.

Entre los marcadores moleculares ampliamente utilizados en estudios genéticos se destacan los microsatélites (MS). Éstos consisten en secuencias simples repetidas (por ejemplo TGTGTGTG....) de longitud variable de acuerdo al número de repeticiones que presentan.

En una población determinada se pueden identificar variantes (denominadas alelos) de cada MS en el ADN; para cada individuo se hereda un alelo del padre y otro alelo de la madre (ambas variantes son identificables por comparación con los padres).

Estos MS presentan las siguientes ventajas desde el punto de vista de su utilización para tipificación genética:

- son muy frecuentes en el ADN (estimándose entre 50 y 100.000 MS en un genoma), lo que permite ampliar el

Unidad de Biotecnología.
 M.T.V. Dra. Lucía Kelly; Lic. MSc. Paula Nicolini;
 Lic. Andrea Branda; Br. Ariel Pedemonte ;
 Asistente Lab. Emma Solares;
 Ing. Agr. Dr. Fabián Capdevielle.
 Dr Ing. Agr. Dan Piestun

Introducción

Los avances científico-tecnológicos relacionados con la genética molecular han permitido mejorar el conocimiento acerca de la organización del genoma bovino -cuya secuencia completa se encuentra actualmente disponible en versión borrador- identificando múltiples regiones dentro del material genético (ácido desoxiribonucleico, ó ADN) con potencial para desarrollar aplicaciones biotecnológicas prácticas basadas en la tipificación de variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN ente diferentes individuos. Estas aplicaciones incluyen desde identificación individual de animales y diagnósticos de paternidad como forma de avalar los registros genealógicos, hasta el desarrollo de herramientas metodológicas para apoyar los procesos de selección por características de interés productivo (sanidad, calidad de productos, etc.).

número de marcadores utilizados para la resolución de casos complejos;

- se encuentran distribuidos en todo el genoma, por lo que permiten estudiar asociaciones con genes localizados en diferentes cromosomas (mapeo genético);
- presentan un alto nivel de variación (varios alelos posibles para cada MS), lo que incrementa la exactitud en casos de identificación individual y diagnósticos de paternidad;
- presentan herencia simple, por la cual cada individuo recibe un alelo de cada uno de sus progenitores;
- no varían a lo largo de la vida de un individuo;
- pueden ser analizados a partir de una pequeña cantidad de material biológico de diversos orígenes (folículo piloso, sangre, semen, músculo, etc.), disponiéndose de técnicas automatizables adaptadas al procesamiento de un gran número de muestras (secuenciadores automáticos).

Estas ventajas facilitan su utilización en los siguientes casos:

- determinación de paternidad en animales de pedigree y animales puros por cruce en casos de servicios múltiples. Este diagnóstico permite corroborar los registros genealógicos, aportando mayor exactitud en la selección fenotípica para caracteres productivos de herencia compleja (producción, sanidad, etc.);
- detección de regiones cromosómicas conteniendo genes que afectan características cuantitativas ("quantitative trait loci", ó QTLs), utilizables para la investigación de diversos rasgos de interés productivo (producción de carne y leche, resistencia a enfermedades, etc);
- identificación de animales individuales a lo largo de la cadena cárnica (trazabilidad) y de muestras relacionadas con casos de abigeato;
- estudios de diversidad genética en razas locales e introducidas.

En muchos casos presentados y discutidos en la literatura científica se dispone de evidencias sobre la existencia de asociaciones significativas entre marcadores moleculares y genes que codifican para alguna proteína de interés productivo (por ejemplo, enzimas con efectos sobre la terneza de la carne).

Debido a la variabilidad existente entre diferentes poblaciones animales es muy importante analizar y validar dichas asociaciones para diferentes razas, con lo cual sería posible desarrollar y difundir un conjunto de marcadores moleculares que contribuyan tanto al aseguramiento de identidad genética en muestras individuales

como a los procesos de selección por caracteres de interés productivo, luego que se validen para nuestras condiciones ambientales y se destaque su importancia en nuestros ganados y en nuestros sistemas de producción.

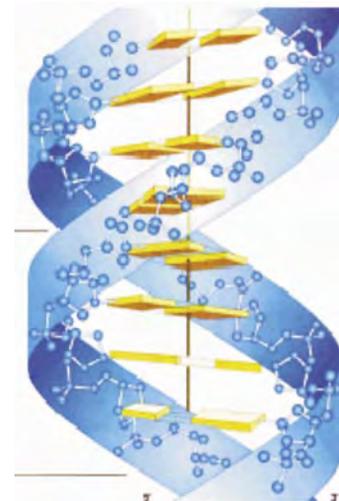
Sistemas de tipificación y aseguramiento de identidad genética

Desde 2005 se ha trabajado en la implementación de técnicas moleculares aplicables en tipificación genética de animales, habiendo seleccionado y validado dos conjuntos de MS para la tipificación de ADN en bovinos (integrados en un Kit-INIA estándar de 9 MS y otro Kit-INIA complementario con 4 MS adicionales). En 2006 estos kits fueron evaluados a nivel internacional a través de la participación de INIA en el test de comparación donde intervienen todos los laboratorios del mundo que son miembros institucionales de la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG, www.isag.org.uk).

Esta comparación se realiza con muestras de ADN bovino enviadas por ISAG, y cada laboratorio analiza 9 MS de uso obligatorio para realizar la verificación de parentesco e identificación individual. Dichos MS integran el Kit-INIA estándar y por lo tanto la participación en dicho test internacional ha permitido compatibilizar los resultados obtenidos por INIA con los obtenidos por distintos investigadores en diversos países del mundo.

Esto permite asegurar que los procedimientos utilizados son objetivos y comparables para chequear la paternidad o identidad de un animal.

El Kit-INIA se ha utilizado recientemente en apoyo al desarrollo de prototipos para aplicaciones tecnológicas del diagnóstico molecular en animales, las cuales se espera transferir a empresas innovadoras nacionales que estén desarrollando servicios de tipificación de ADN para cabaneros, productores ganaderos y otros interesados.



Diagnóstico de paternidad

La tipificación genética mediante MS permite apoyar los programas de mejoramiento genético a través de diagnósticos de paternidad, incrementando la precisión en la identificación de los reproductores. En este caso el Kit-INIA desarrollado puede contribuir a disminuir el costo de implementación de servicios de tipificación de ADN, mediante la estandarización de técnicas para extracción de ADN, identificación de variantes y base de datos conteniendo muestras de diferentes razas.

Con el fin de identificar marcadores que aporten mayor información para diferentes aplicaciones se estimaron las frecuencias de los diferentes alelos para los MS que integran el Kit-INIA sobre una muestra de bovinos Hereford (Kelly y col., 2005). En este trabajo se estimó el contenido de información genética de cada MS, observándose que 7 de los 11 MS analizados (TGLA227, TGLA53, SPS115, TGLA126, TGLA122, ETH225, BM1824) presentaron un alto valor informativo según el número de alelos, para estudios de paternidad, identidad y trazabilidad.

Para determinación de paternidad, se realizaron comparaciones de los alelos existentes para 9 MS entre hijos y sus padres presuntivos. A continuación tenemos un ejemplo en bovinos, donde se designan los alelos de un MS según su peso molecular (expresado en pares de bases en el ADN, Figura 1).

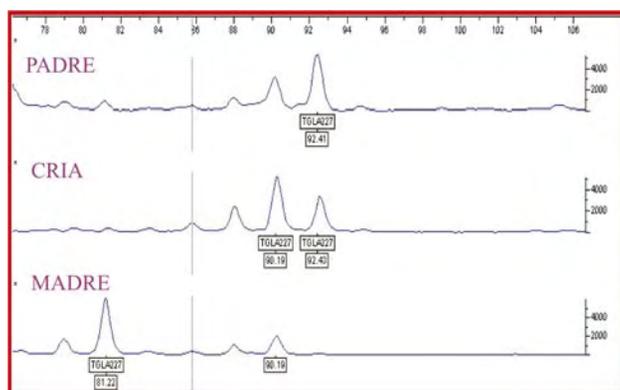


Figura 1 - Fenograma producido por el programa del secuenciador de ADN Automático ABI 310. Los picos numerados indican los alelos existentes, transmitiendo el padre el alelo 92 a la cría (90/92) y el 90 la madre (81/90).

Para establecer la imposibilidad de que un individuo sea el padre en un cruzamiento (incompatibilidad de una filiación) se han aplicado dos reglas de exclusión (Mériaux J.C, 1992), basadas en la primera ley de Mendel (ley de segregación):

- a) se excluyen los padres cuando el hijo contiene un alelo que no existe en los mismos.
- b) se excluye el padre cuando no trasmite uno de sus alelos a la descendencia.

En el fenograma de la Figura 1 se muestra que existe coincidencia entre la cría y sus dos padres. La efectividad de los tests de paternidad se calcula como la probabilidad de exclusión (PE) para detectar paternidades incorrectas, lo que depende de la raza y del polimorfismo existente para los MS considerados. En este caso la PE obtenida testando 9 MS indica que existe una probabilidad cercana a 99,9% de excluir los padres que hubieran sido asignados en forma errónea (Usha y col. 1995).

Trazabilidad

La importancia que tiene la carne bovina en la economía del Uruguay requiere trabajar previniendo problemas sanitarios y de inocuidad, así como adecuarse a los requerimientos de calidad establecidos por diferentes mercados. En particular, la Unión Europea ha puesto en marcha un programa de trazabilidad respecto a distintos productos cárnicos, generando mayores exigencias a los países proveedores para que implementen programas similares. La trazabilidad, según la norma ISO 8402, implica el seguimiento del producto hasta su comercialización y puesta a disposición del consumidor, permitiendo determinar los antecedentes y la localización de cada entidad mediante identificaciones registradas.

El MGAP ha implementado un sistema de identificación electrónica (chips en caravanas electrónicas) con el fin de realizar un seguimiento del animal desde su nacimiento hasta los productos derivados de su faena.

En relación a este tema se realizó un trabajo experimental cuyo objetivo fue demostrar la aplicación de la tecnología de tipificación del ADN bovino como apoyo para verificar la trazabilidad realizada por métodos electrónicos, a través de la comparación de muestras originadas en los animales desde su origen hasta la segunda balanza (Kelly y col. 2006)(Figura 2).

Cuadro 1 - Nº alelos de cada Microsatélites analizado del Kit_INIA.

MS	TGLA 227	BM 2113	TGLA 53	ETH 10	SPS 115	TGLA 126	TGLA 122	INRA 23	ETH 3	ETH 225	BM 1824
Nº alelos	6	5	6	3	6	7	8	4	4	6	6

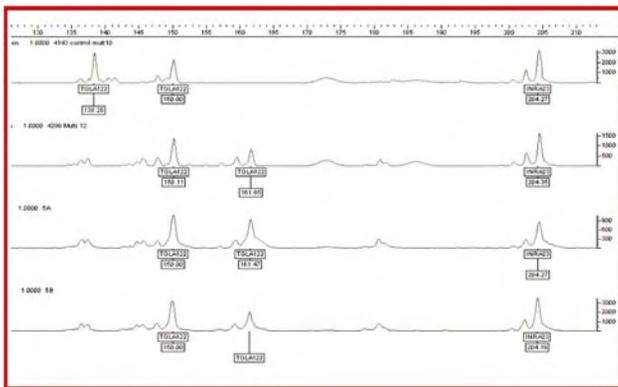


Figura 2 - Electroferograma con los alelos de dos MS (TGLA122 e INRA 23) pertenecientes a la muestra 4299 y sus respectivas carcasas 5A y 5B, usando como control la muestra 4243, testada según las normas del ISAG.

La aplicación de la tipificación de ADN con el Kit-INIA se realizó a través de la comparación de los genotipos de las diferentes muestras obtenidas en origen (pelo), y aquellas obtenidas en la segunda balanza (músculo) durante la faena. El resultado entre las muestras de pelo y músculo fue coincidente en el 100 % de los casos estudiados para ese tramo de trazabilidad.

Abigeato

Dentro de las posibles aplicaciones de la tipificación de ADN se encuentra su uso como herramienta para la identificación de muestras involucradas en casos de abigeato.

Cuando se comparó una muestra de músculo incautada respecto a diferentes muestras tomadas de restos animales relacionados con una situación de abigeato, la tipificación de ADN utilizando el Kit-INIA permitió reconocer la muestra incautada con un 100% de identidad (identificación positiva) respecto a los restos animales, mientras que otras muestras problema presentaron entre 0 % y 56 % de identidad (identificación negativa).

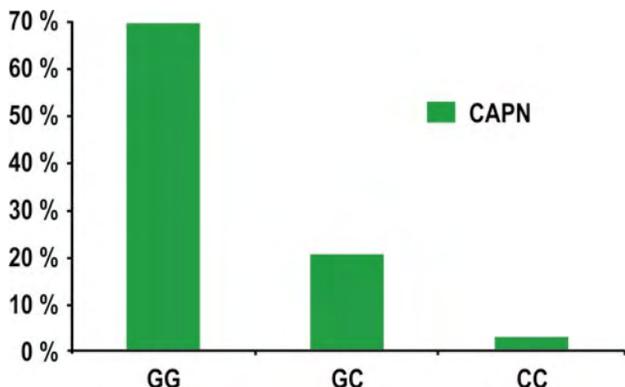


Figura 3 - Porcentaje de individuos con copias favorables (G=*) del gen de CALPN 1₅₃₀ (Calpaína).

Investigaciones actuales en Biotecnología animal

Genes vinculados a la calidad de carne

El Uruguay es un país exportador de carne debiendo adaptar su calidad a los requerimientos de diferentes mercados internacionales. Estos mercados valoran la terneza y el veteado que son indicativos de la calidad. En el marco del PROCISUR y con apoyo de la Sociedad de Criadores Hereford se están estudiando algunos genes vinculados a la calidad de carne.

En una muestra de animales provenientes de diferentes regiones del país, se estudiaron las frecuencias de las variantes alélicas para algunos de estos genes como la calpaína (CPN1) y tiroglobulina (TG5) mediante la técnica PCR-RFLP.

Los resultados preliminares que se observan en las figuras 3 y 4 indicaron que el alelo favorable - CPN1 530 (G)- del gen que afectaría la terneza tiene una frecuencia génica de 86,8 % en la muestra de animales analizados, mientras que el alelo favorable -TG5 (T)- para el gen que actuaría en el grado de veteado de la carne tendría una frecuencia génica (T) relativamente baja (33,4%), pero que se encuentra en aumento, como se aprecia en la figura 4, en la columna central que marca los individuos portadores (TG) (Kelly y col., 2007).

Marcadores genéticos asociados con resistencia a parásitos gastrointestinales en ovinos

La identificación de marcadores moleculares asociados a la resistencia a los parásitos gastrointestinales permitiría identificar con más facilidad y rapidez los animales resistentes, aumentando la eficiencia de selección.

En nuestro país, se han realizado estudios preliminares en la raza Corriedale en una colaboración entre Facultad de Veterinaria, SUL e INIA, detectándose nuevos alelos del gen Ovar-DRB1.2 en la muestra analizada.

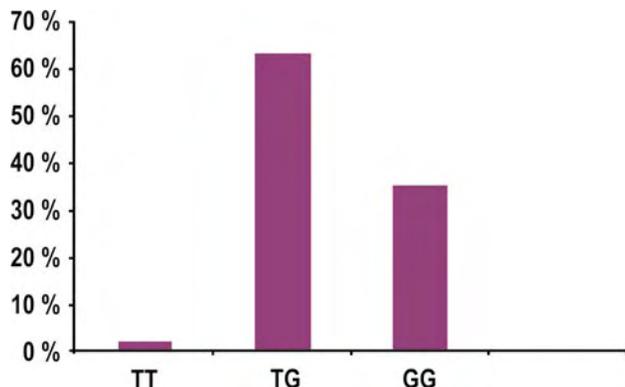


Figura 4 - Porcentaje de individuos con copias favorables (T=*) del gen de TG (Tiroglobulina).

En el marco de un proyecto financiado por el Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT-DICYT) se han iniciado investigaciones en la Unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas sobre ovinos del Núcleo Merino Fino (Unidad Experimental "Glencoe", INIA Tacuarembó), con la finalidad de caracterizar variantes del gen DRB1.2 y de algunos MS con potencial para identificar individuos con diferentes niveles de resistencia a parásitos gastrointestinales (estimada a través del recuento de huevos de los parásitos por gramo de materia fecal ó HPG).

Se espera que la aplicación de procedimientos de selección asistida por marcadores permita aumentar la eficiencia de la selección para la resistencia a nemátodos gastrointestinales (Nicolini, 2006). y contribuya a la disminución del impacto sanitario-económico de estas infecciones sobre la producción ovina nacional.



Conclusiones

- En los últimos dos años la Unidad de Biotecnología ha desarrollado y adaptado procedimientos biotecnológicos aplicables en la tipificación de ADN en bovinos, con el respaldo de ensayos y validaciones a nivel internacional (ISAG).
- La tipificación de ADN utilizando el KIT-INIA ha permitido evaluar diversos casos de uso de prototipos de diagnóstico molecular que resultan de interés para su implementación y aplicación comercial por parte de empresas innovadoras enfocadas a:
 - a) apoyar programas de mejoramiento genético avalando con gran precisión la identificación de los reproductores y la determinación de paternidad en el caso de servicios múltiples.
 - b) colaborar en la auditoría de los sistemas de identificación electrónica que se están implementando en Uruguay
 - c) incorporarse como un componente en servicios tecnológicos que contribuyan a la certificación de calidad para nuestras carnes bovinas.
 - d) proveer información utilizable por peritos técnicos para identificar muestras en casos de abigeato
- Asimismo se ha avanzado en las etapas iniciales de caracterización de polimorfismos para algunos genes relacionados con calidad de carne en bovinos y resistencia a parásitos en ovinos, los que podrían ser incorporados en sistemas de selección asistida por marcadores, una vez que se valide su asociación con características funcionales en nuestras condiciones productivas.

Agradecimientos

Lic, Verónica Gutiérrez, Sociedad Criadores Hereford.

Otros técnicos de INIA participantes en las investigaciones

Ing. Agr. PhD. O. Ravagnolo
 Ing. Agr. PhD. G. Ciappesoni
 DMV. MSc. A. Mederos
 Ing. Agr. I. De Barbieri
 Ing. Agr. PhD. F. Montossi
 DMV. A. Rodríguez.
 Ing. Agr. MSc. O. Cardozo.
 Ing. Agr. V. Aguerre

Bibliografía

- Kelly L.; Solares E.; Cardozo O; Aguerre V.; Capdevielle F. 2005. Avances en la tipificación de ADN en bovinos en una muestra de población cruce Hereford del Uruguay. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. 9-11 de Junio. Paysandú. Uruguay.
- Kelly L.; Pedemonte A. ; Solares E. ; Cardozo O; Aguerre V.; Capdevielle F. 2006. Verificación mediante análisis de ADN de la trazabilidad electrónica de carne bovina desde su establecimiento a la faena. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Junio. Paysandú. Uruguay.
- Kelly L.; Solares E. ; Ravagnolo O; Rincón G.; Capdevielle F. 2007. Marcadores genéticos asociados a calidad de carne en una muestra de reproductores de raza Hereford. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Junio. Paysandú. Uruguay.
- Mériaux J.C.1992. Controle de filiation et marqueurs sanguins chez les équidés. Recueil de Médecine Vétérinaire Spécial Reproduction de Equidés.
- Nicolini M.P. 2006. Estudio del polimorfismo del gen DRB1.2 del MHC ovino. Búsqueda de asociaciones con resistencia a parásitos gastrointestinales. Tesis de Maestría. PEDECIBA, UdelaR. Uruguay.
- Usha A.P., Simpson S.P., Williams J.L. 1995. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. Anim. Genet. 26.