TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS DE INTERÉS EN ANIMALES DOMÉSTICOS.

Armand Sánchez Bonastre
Unitat de Genètica i Millora, Facultat de Veterinària Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

Introducción:

Uno de los problemas iniciales que debemos afrontar para que las técnicas de Genética Molecular puedan ser aplicadas con éxito en la Mejora Genética de las especies productivas, radica en la identificación de genes responsables de los carácteres de interés. Para ello, el estudio del genoma (encaminado a la obtención de mapas genéticos) unido al desarrollo de técnicas analíticas eficientes para la identificación de la variabilidad genética, resultan capitales. Adicionalmente, las variantes genéticas pueden emplearse en problemas de identificación individual y pruebas de paternidad, estudios de genética de poblaciones y diagnóstico de patologías hereditarias. Durante estos últimos años se han desarrollado un conjunto de técnicas de laboratorio basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**), que facilitan el análisis rápido de un elevado número de muestras y la detección de variantes genéticas en las regiones de ADN amplificadas. El diagnóstico de las variantes puede realizarse de forma directa si conocemos su secuencia nucleotídica con técnicas que amplifiquen selectivamente un alelo determinado o haciendo uso de las diferencias en lugares de corte por endonucleasas de restricción.

Otras técnicas más indirectas permiten diferenciar a las variantes, sin el conocimiento previo de su secuencia, por el distinto comportamiento electroforético de las mismas. Entre estas técnicas podemos destacar la **SSCP** (*single strand conformation polymorphism*) (Prosser, 1993) o la **DGGE** (*denaturing gradient gel electroforesis*) (Fodde y Losekoot, 1994), que se basan en los cambios de movilidad electroforética, relacionados con diferencias en su secuencia nucleotídicade, que presentan las moléculas de ADN de cadena simple o en proceso de desnaturalización y que potencialmente permiten detectar sustituciones nucleotídicas simples.

En los últimos años los dos tipos de polimorfismos del ADN más numerosos y estudiados han sido los **RFLPs** (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, debidos a la existencia de variabilidad para el número o posición de dianas para la digestión con una determinada endonucleasa de restricción) y los microsatélites o **SSRs** (repeticiones de secuencia simple) con variantes debidas a la presencia de un número variable de repeticiones de di-, tri- o tetranucleótidos, muy abundantes y de distribución aleatoria en el genoma de los organismos eucariotas.

Los microsatélites se han convertido actualmente en los marcadores de elección en todos los proyectos encaminados a la elaboración de mapas genéticos en especies domésticas. El establecimiento de estos mapas, con un número suficiente de marcadores informativos, constituye un paso necesario para poder afrontar el análisis de la base genética de los caracteres complejos. El método más clásico de análisis empleando estos marcadores se basa en la detección de desequilibrio de ligamiento, que posibilita la ulterior identificación de

regiones del genoma candidatas a ubicar genes responsables de los carácteres estudiados. Sin embargo, existen técnicas alternativas de análisis del genoma, de creciente importancia en los estudios de genética molecular aplicada y que revisaremos a continuación.

Técnicas de análisis aleatorio del genoma:

Podemos también identificar variantes genéticas de interés en el ADN mediante un conjunto de técnicas que genéricamente podemos denominar de "fingerprinting" o "impronta genética". Estas técnicas producen patrones con un número discreto de bandas características de cada ADN analizado. Las bandas corresponden a fragmentos obtenidos en un sistema exponencial de amplificación "in vitro" del ADN. Para ello suelen emplearse uno o varios cebadores, de secuencia parcial o totalmente aleatoria, o bien basada en determinadas secuencias de copia única o repetida del genoma. Estos cebadores hibridan total o parcialmente en lugares no definidos del genoma y permiten la amplificación de un número variable de bandas sin que sea preciso un conocimiento previo sobre la secuencia de las regiones amplificadas.

Se han descrito diversas aproximaciones metodológicas para este tipo de análisis, la más conocida de las cuales és la amplificación aleatoria de ADN polimórfico o **RAPD** (*random amplified polymorphic DNA*) en la que se utilizan cebadores cortos (9-10 nucleótidos) de secuencia aleatoria (Williams, J.G.K. y col. 1990). Esta técnica ya ha sido empleada con éxito en diversas especies domésticas (revisado en Cushwa, W.T. y J.F. Medrano, 1996). Otras técnicas parecidas difieren básicamente en la longitud, secuencia y concentración de cebador usado en la reacción de amplificación del ADN y en la complejidad de los patrones obtenidos (Welsh, J. y M. McClelland. 1990; Caetano-Anollés, G. y col. 1991).

Una metodología alternativa consiste en la introducción artificial de motivos de secuencia conocida, mediante la unión de fragmentos cortos de ADN, denominados adaptadores, que incrementa sustancialmente el número de fragmentos amplificados y en consecuencia la complejidad y riqueza informativa de los patrones obtenidos. Una variante de esta técnica, denominada **AFLP** (amplified fragment lenght polymorphism) (Vos y col., 1995), se basa en la amplificación selectiva de fragmentos generados por la digestión de ADN genómico mediante endonucleasas de restricción.

Esta amplificación selectiva se consigue mediante la unión de oligonucleótidos específicos a los fragmentos resultantes de la digestión. Los patrones resultantes son altamente polimórficos y permiten la obtención de un elevado número de marcadores. La técnica, desarrollada inicialmente en especies vegetales, está resultando especialmente útil en el caso de genomas en los que se dispone de escasa información genética (Ziegle y col. 1996).

Posibilidades y limitaciones de las técnicas de análisis aleatorio del genoma:

Los polimorfismos que se observan al comparar dos ADNs sometidos a estas técnicas analíticas son el resultado de cambios en su secuencia (mutaciones puntuales, inserciones, deleciones y reordenaciones) que añaden, eliminan o modifican los lugares de hibridación de los cebadores en la reacción de amplificación.

Estos polimorfismos representan variantes alélicas, y en consecuencia, la identificación de bandas asociadas a determinados fenotipos permite su ulterior caracterización molecular. Una vez conocida la secuencia de estas bandas, podemos desarrollar marcadores PCR más específicos para el carácter objeto de estudio, que suelen denominarse **SCARs** (*PCR-based sequence characterized amplified regions*).

Estos protocolos de análisis aleatorio resultan rápidos y en general sencillos de aplicar, aunque no estan exentos de problemas técnicos cómo la dependencia de los parámetros de amplificación, su reproducibilidad y ocasionalmente la presencia de bandas artefactuales (no parentales). Además, el número de alelos que se detectan para cada marcador no suele ser muy elevado, a diferencia de lo que ocurre con los marcadores del tipo microsatélite o con los RFLPs. Esta limitación se ve ampliamente compensada por el elevado número de marcadores que pueden obtenerse de forma simultánea. Sin embargo un número significativo de estos polimorfismos (entre un 70 y 90%) es de naturaleza dominante (bandas presentes o ausentes) lo que obliga a su caracterización como **SCARs** antes de poder ser aplicados.

Técnicas basadas en la comparación de genomas:

La construcción de mapas comparativos en diversas especies, que permitan encontrar las regiones de homología entre ellas, constituye una vía optima para poder aprovechar de forma sinérgica la información. Para ello es importante encontrar y caracterizar genes homólogos en diversas especies, así de los 4344 genes humanos cartografiados y los 5554 en ratón sólo 1889 lo están en ambas especies (Enero de 1997). Con este objetivo se han propuesto técnicas de análisis como el **CATS** (*Comparative anchor tagged sequences*) que permiten incrementar rápidamente este tipo de información (Lyons. L.A. y col. 1997).

Aplicando esta técnica se han podido identificar 410 genes cartografiados, para los que se disponía de secuencia de ADN en, al menos, 2 especies y que han sido optimizados para poder realizar su análisis por PCR en diversas especies (han sido probados en 20 especies de mamíferos representando un total de 11 órdenes distintos).

La utilización de estos marcadores, verdaderos "comodines" interespecíficos, permite acelerar el trasvase de información de las especies más estudiadas a las demás. La ampliación del número de CATS permitirá que para cualquier gen de interés que haya sido cartografiado en una especie podamos investigar la presencia de sus correspondientes homólogos en otras especies.

Otra aproximación posible consiste en la búsqueda directa de marcadores, mediante el análisis comparativo de dos genomas o **RDA** (*Representational Difference Analysis*). Esta metodología de análisis basada en técnicas de hibridación sustractiva (Lisitsyn et al., 1993; 1995) permite identificar diferencias entre dos genomas objeto de comparación, mediante la búsqueda de regiones de ADN presentes en una muestra pero ausentes o minoritarias en otra. A los fragmentos obtenidos por digestión del ADN genómico con un enzima de restricción, se les unen adaptadores que permitan su amplificación por PCR.

El conjunto de fragmentos amplificados es desnaturalizado y puesto a hibridar con un exceso del ADN genomico objeto de comparación, cuyos fragmentos no han sido ligados a estos adaptadores y por tanto no

son amplificables por PCR. Los productos obtenidos en la PCR inicial constituyen una "representación" de genoma (los que presentan un tamaño susceptible de amplificación suponen aproximadamente un 10% de mismo), lo que hace necesario la preparación de réplicas digeridas con enzimas de restricción diferentes.

Perspectivas:

El proyecto genoma humano ha facilitado el desarrollo de técnicas automatizadas de análisis del ADN. En primer lugar, la posibilidad de detectar electroforéticamente fragmentos de ADN marcados con fluorescencia ha permitido la aparición de los secuenciadores automáticos de ADN que también son empleados en el análisis de microsatélites. Alternativamente se han desarrollado sistemas, basados en técnicas fotolitográficas, capaces de sintetizar y colocar miles de fragmentos de ADN en un soporte sólido (vidrio o silicio) que pueden ser empleados en protocolos de hibridación, en lo que se ha llamado "Chips de ADN" (Fodor y col., 1991; Southern, 1996). La posibilidad de emplear fragmentos de ADN genómico, clones de ADNc y oligonucleótidos en un "chip" (con unos 10^7 fragmentos de ADN por cm^2) supone una verdadera revolución en nuestra capacidad de analizar patrones de expresión génica, desarrollar proyectos de cartografía genética o identificar mutaciones en genes de interés.

La próxima generación de sistemas de genotipado automático estará basada en colecciones de oligonucleótidos colocados en un chip (Chee y col., 1996; Yershov y col., 1996) que permitirán analizar de forma simultánea un mínimo de 6.000 mutaciones o marcadores distintos. En consecuencia cabe pensar en una futura avalancha de información incluso para las especies actualmente menos estudiadas.

La genética molecular en las dos últimas décadas se ha visto casi limitada desde el punto de vista metodológico al estudio de genes individuales. La aparición de estas tecnologías, junto a la existencia de mapas genéticos cada vez más completos, abre nuevas perspectivas para la identificación y localización cromosómica de genes que controlan los carácteres de naturaleza poligénica en especies domésticas, verdadero desafío de la Genética Animal para la próxima década.

Bibliografía:

Caetano-Anollés, G. y col., 1991. Bio/Technology 9: 553-557.
Chee, M. y col., 1996. Science, 274: 610-614.
Cushwa, W.T. y J.F. Medrano, 1996. Animal Biotechnology, 7 (1): 11-31.
Fodde, R. y M. Losekoot, 1994. Human Mutation, 3: 83-94.
Fodor, S.P.A. y col., 1991. Science, 251: 767-773.
Lisitsyn, N. y col., 1993. Science 259: 946-951.
Lisitsyn, N.A., 1995. Trends Genet. 11: 303-307.
Lyons. L.A. y col., 1997. Nature Genetics 15 (1): 47-56.
Money, T., y col., 1996. Nucleic Acids Res. 24: 2616-2617.
Prosser, J., 1993. Trends in Biotechnology, 11: 238-246.
Southern, E.M., 1996. Trends in Genetics, 12: 110-115.
Vos, P. y col., 1995. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414.
Welsh, J. y M. McClelland, 1990. Nucleic Acids Res. 19: 861-866.
Williams, J.G.K. y col., 1990. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.
Yershov, G. y col., 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 4913-4918.
Ziegle, J. y col., 1996. Proc. ISAG Meet. p. 112.