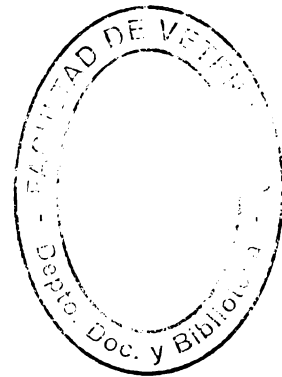


**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**SEGUIMIENTO DE LOS IDENTIFICADORES DE LA TRAZABILIDAD ELECTRÓNICA
MEDIANTE EL ANÁLISIS DE DNA BOVINO**

Por

Ariel PEDEMONTTE



TESIS DE GRADO presentado como uno de los
requisitos para obtener el Título de Doctor en
Ciencias Veterinarias.
(Orientación **MEDICINA VETERINARIA**)

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2008**

103 TG
Seguimiento de
Pedemonte, Ariel



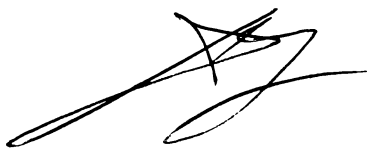
TESIS DE GRADO aprobado por:

Presidente de mesa:



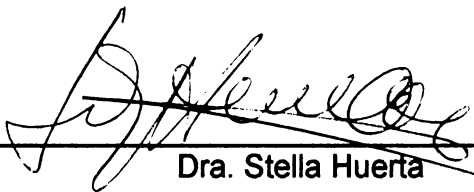
Ing. Agr. Daniel Garin

Segundo miembro (Tutor)



Msc. PhD. Lucia Kelly

Tercer miembro



Dra. Stella Huerta

Fecha

20/6/2008

Autor



Ariel Pedemonte

28.014

II

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a la Dr.M.V.T. Msc PhD Lucía Kelly por su dirección y a Emma Solares por el apoyo brindado durante la realización de la tesis.

Agradezco al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA Las Brujas) por brindar el soporte necesario para la ejecución de este trabajo. Extendiéndolo al personal que me apoyo en todo momento, especialmente a la Unidad de Biotecnología donde se desarrollo la fase experimental, también a los Ing. Agr. Osvaldo Cardozo y Verónica Aguerre.

Al Frigorífico Solís donde se realizó una de las fases experimentales.

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República y a todos mis compañeros y amigos de la Facultad que de una u otra manera me apoyaron en la realización del proyecto y en el transcurso de la carrera.

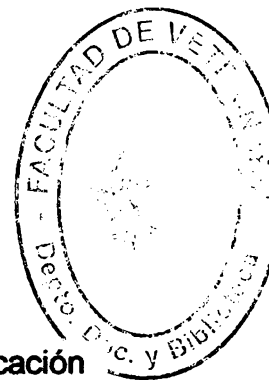
Y principalmente quiero agradecer a mis padres y hermanos ya que por su apoyo pude llegar a la culminación de mi carrera, en especialmente a mi hermana Ing. Agr. Ana Pedemonte por sus valiosos aportes.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura I.....	6
Figura II.....	9
Figura III.....	10
Figura IV.....	18
Figura V.....	21
Cuadro I.....	30
Cuadro II.....	33
Figura VI.....	34
Figura VIII.....	35
Figura IX.....	36
Figura X.....	36
Cuadro III.....	37

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	IV
1 RESUMEN.....	2
2 SUMMARY.....	2
3 INTRODUCCIÓN.....	3
4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
4.1 TRAZABILIDAD ELECTRÓNICA.....	5
4.1.1 <i>Dispositivos de radiofrecuencia y seguimiento de información.....</i>	5
4.1.2 <i>Registro de la información en bases de datos.....</i>	6
4.1.3 <i>Antecedentes de la trazabilidad a nivel mundial.....</i>	7
4.1.4 <i>Trazabilidad en nuestro país.....</i>	10
4.2 TRAZABILIDAD POR DNA: MARCADORES MOLECULARES.....	17
4.2.1 <i>Marcadores Tipo I.....</i>	18
4.2.2 <i>Marcadores Tipo II.....</i>	18
4.2.3 <i>Marcadores Tipo III.....</i>	25
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 MATERIALES.....	27
5.2 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS.....	27
5.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	29
5.3.1 <i>Extracción de DNA.....</i>	29
5.3.2 <i>Evaluación del DNA.....</i>	31
5.3.3 <i>Amplificación del DNA.....</i>	32
5.4 MÉTODO DE ANÁLISIS DE DATOS.....	35
5.4.1 <i>Lectura de los datos del Secuenciador.....</i>	35
6 RESULTADOS.....	37
7 DISCUSIÓN.....	41
8 CONCLUSIÓN.....	45
9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46



1 RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo la aplicación de técnicas de tipificación de DNA para avalar la identificación electrónica, en algunas etapas de la cadena cárnica dentro del Sistema de Identificación y Registro Animal (S.I.R.A.), implementada por parte del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (M.G.A.P.). Se efectuó la comparación del genotipo de DNA de las muestras obtenidas en el lugar de cría (pelo) con los obtenidos en la segunda balanza durante la faena (músculo). Se compararon 11 bovinos de un rodeo de 40 animales. Se analizó el DNA mediante un PCR-múltiplex con 9 microsatélites en un secuenciador automático. El resultado de las muestras de pelo y músculo identificadas electrónicamente como pertenecientes al mismo animal, coincidieron en un 100%. Se concluye que no hubo fallas en la identificación por chips y el numero ordinal de faena durante estas etapas, por lo tanto el análisis de DNA permitiría auditar el sistema de individualización electrónica que se están implementando en Uruguay según la ley 17997 de Trazabilidad, contribuyendo a consolidar el rastreo de cualquier evento a lo largo de toda la cadena cárnica, siendo una garantía para los consumidores y los mercados importadores de nuestras carnes bovinas.

2 SUMMARY

The objective of this study was the application of DNA typing techniques to affirm the identifier of traceability electronics, in a stage of the chain meat within the system for the identification and registration through chip, implemented by the Ministry of Livestock, Agriculture and Fisheries (MGAP). It to made comparison of the genotypes of samples collected at source (hair) and the balance during the second site (muscle). We compared 11 cattle from a herd of 40 animals. DNA was analyzed by a PCR-múltiplex of 9 short tandem repeat and an automatic sequencer. The result of the samples of hair and muscle identified as belonging to the same animal by these methods agreed by 100%. Therefore, there have been no detected flaws in the tazability by chips and ordinal number of fishing during these stages. It is concluded that DNA analysis would audit the electronic traceability system being implemented in Uruguay by law 17997, helping to consolidate a certificate of quality for our bovine meat.

3 INTRODUCCION

En la actualidad, con el creciente interés por parte de los consumidores de conocer la procedencia y la forma de elaboración de los alimentos que consume, se han ido desarrollando diferentes técnicas para cumplir con dichos fines, entre ellas tenemos la trazabilidad como modo de brindar transparencia a la cadena alimentaria.

De acuerdo a la norma I.S.O. (Organización Internacional de Estandarización) se define la trazabilidad según norma ISO 8402, 1994 como "Habilidad de trazar el origen y la historia de transformaciones o localizaciones de una entidad cualquiera, por medio de registros de información".

Por otro lado exige la exacta y única identificación de cada entidad en la cadena, con información referente a la identidad del animal, sus derivados y una base de datos para almacenar registros reportando vínculos de interés como: sexo, raza, edad, sistema productivo, tipo de alimentación, procedencia, movimientos, sanidad, comercialización de productos.

A nivel mundial surgió como respuesta a la incertidumbre instaurada en el correr de los últimos años por parte de los consumidores, ante la aparición de enfermedades transmitidas por los alimentos (encefalopatía espongiiforme bovina). Esto produjo una caída importante en el consumo de carnes y como consecuencia los gobiernos de los distintos países implementaron normas de protección para los consumidores, debido a la presión creada por los mismos. En particular, la Unión Europea ha puesto en marcha un programa de trazabilidad a distintos productos cárnicos, lo que generó cada vez mayores exigencias respecto a los países proveedores para que implementen programas similares (Arias, 2005).

La trazabilidad es de gran importancia para el Uruguay ya que exporta más del 60% de lo faenado anualmente, (Oficina de programación y políticas agropecuarias, O.P.Y.P.A., 2006) siendo por tanto un país influenciado por las exigencia de los mercados exteriores en este rubro, como la prevención problemas sanitarios como la Fiebre Aftosa. Por lo tanto esta herramienta permite investigar sobre la inocuidad de los alimentos para adecuarse a los requerimientos establecidos por diferentes mercados importadores (Fonseca, 2005).

En el 2002 el MGAP del Uruguay promovió un Sistema Nacional de Información Ganadera (SNIG) para optimizar el sistema de trazabilidad grupal e iniciar una fase piloto individual a través de caravanas electrónicas; siendo uno de los primeros países del mundo al contar con esta tecnología y acceder a mercados como la Unión Europea (Piperno y Oliveira, 2005).

Considerando este importante avance realizado por el M.G.A.P. para impulsar la trazabilidad de la carne uruguaya, sería favorable disponer de técnicas de tipificación de DNA para ser aplicadas en los animales incorporados al sistema, a los efectos de verificar el origen de los mismos, determinar puntos de riesgo que puedan afectar la identificación electrónica (especialmente durante la pérdida de la identificación del animal durante el procesamiento en el frigorífico, punto de mayor riesgo de pérdida de identidad) y permitir el seguimiento de los cortes hasta su depósito y posteriormente el consumidor (del campo al plato).

La tipificación de DNA se realiza mediante marcadores moleculares denominados microsatélites que ofrece una probabilidad cercana al 100% en la identificación de las diferentes muestras de animales.

Por lo tanto el presente trabajo presenta por objetivos primero desarrollar esta tecnología de tipificación del DNA bovino, mediante la utilización de microsatélites partiendo de muestras animales de diferente origen para comparar la exactitud de la identificación electrónica.

Segundo, demostrar la aplicabilidad de esta tecnología como forma de apoyar y avalar la etapa de la identificación electrónica, a través de su comparación de muestras originadas a partir de los animales vivos (folículos pilosos) respecto a las obtenidas posteriores a su faena (tejido muscular).

4 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

4.1 TRAZABILIDAD ELECTRONICA

El concepto de trazabilidad surge como la posibilidad de disponer de información relativa a cada animal, incluyendo la raza, sexo, edad, procedencia, movimientos, sistema productivo, tipo de alimentación, problemas sanitarios, medicamentos aplicados así como el proceso de transporte, sacrificio, procesado y comercialización de productos o subproductos (Sierra, 2005).

Como se mencionó anteriormente la misma constituye una herramienta que implica el seguimiento del animal desde su nacimiento hasta los productos derivados de la faena del mismo, pasando a través de la comercialización y puesto a disposición del consumidor. Por ejemplo al transferir el número electrónicamente de una caravana al código de barras sobre la carcaza, nos permite usar ese número para correlacionar al animal vivo con la carcaza a través del proceso de clasificación y fabricación (Smith, 2001).

4.1.1 Dispositivos de radiofrecuencia y seguimiento de información

La identificación electrónica (IDE) en nuestro país se efectúa mediante dispositivos pasivos por radiofrecuencia que consta de dos partes: a) el identificador que contiene un transponder pasivo (sin baterías) colocado en el animal y que contiene el código de identificación individual; b) Un tranceptor o lector, que consta de un módulo de radio-frecuencia encargado de la emisión de ondas electromagnéticas al transponder, éste último emite una señal con su código correspondiente y luego el lector recibe esta información y la interpreta. El código de identificación individual, se obtiene como respuesta a su activación por el campo electromagnético emitido por el lector (Garín, 2002) (Crescionini, Iribarne 2006).

Requisitos que debería cumplir un buen identificador son:

- permanente, único y que acompañe al animal durante toda su vida,
- mínima la probabilidad de pérdida del dispositivo,
- un instrumento adecuado para demostrar la propiedad del animal,
- funcional a la certificación de la hacienda y manejo realizado, cualquiera sean los requisitos (producción orgánica, apelación de origen, objetivo exportador, etc.)

- eficiente en el manejo del rodeo, mediante su lectura rápida y correcta transmisión de datos, facilitando las tareas de registro y, también, la emisión de planillas,
- adecuado a las normas internacionales,
- inalterable,
- no contamine ni dañe el producto (Garrido, 2006).

En conclusión que nos permita relacionar todos los movimientos dentro de la cadena productiva. En rumiantes hay tres tipos de identificadores electrónicos: transpondedores inyectables, caravanas electrónicas bolos ruminales.

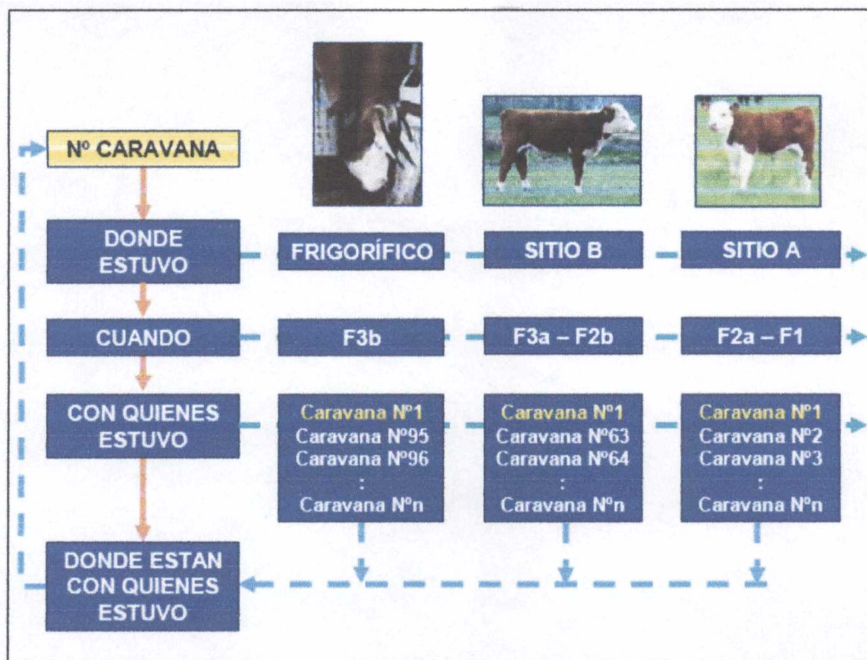
En Uruguay se ha optado en cada animal por el uso de dos caravanas: la electrónica y la visual.

En tanto que a nivel de frigoríficos si bien se tatúa con un número ordinal la carcaza, en cambio los cortes de los animales cuando se troza la carcaza, y se convierte en bifés, lomos, asados, o materia prima para la carne picada, tenemos mayor dificultad para rastrear estas partes cuando las plantas industriales son muy grandes ya que la misma se realiza mediante una etiqueta con código de barra que se deposita sobre el corte de carne (Smith, 2001).

4.1.2 Registro de la Información de origen de la carne en bases de datos

El sistema de trazabilidad deberá estar organizado en razón de sus objetivos y tomando en cuenta las especies y sistemas de producción. La trazabilidad en la práctica no constituye un sistema aislado sino que abarca también aspectos de identificación vinculantes al aspecto sanitario. Por su propia naturaleza resulta fundamental recabar grandes volúmenes de información, almacenarla en forma coherente y posibilitar consultas rápidas. (Sienra, 2005).

En términos generales esa información se recaba en un sitio (es una entidad geográfica única y descriptible); en los lugares geográficos donde estuvieron los animales. Por tanto, sitios como predios de producción, ferias y frigoríficos entre otros deben ser identificados. La identificación de los sitios implica la asociación de una identidad única e inequívoca a cada sitio (fig. 1). Por tanto, cada identidad esta asociada a sólo un sitio, y cada sitio tiene asociado sólo una identidad. Dicha identidad en Uruguay está dada por el número de establecimiento en DI.CO.SE. (S.I.R.A, 2007).



F1: fecha de nacimiento; F2a: fecha de salida del sitio A; F2b: fecha de llegada al sitio B; F3a: fecha de salida del sitio B; F3b: fecha de llegada al frigorífico.

Figura I: Preguntas básicas que debe contestar el sistema en su primera etapa como: conocer su origen, donde estuvo y con quien.

4.1.3 Antecedentes de la trazabilidad a nivel mundial

La Unión Europea ha sido pionera en impulsar y poner en marcha un programa de trazabilidad a partir de problemas detectados con la Encefalopatía Espongiforme Bovina, su finalidad fue recuperar la confianza de los consumidores respecto a distintos productos cárnicos, lo que a su vez generó cada vez mayores exigencias respecto a los países proveedores para que implementen programas similares (Arias, 2005).

En este ítem detallaremos algunos países que por importancia, producción o localización nos situarían como referencia.

La Unión Europea es donde se normalizaron los sistemas de identificación animal y registro intracomunitario. La legislación en cuanto a la identificación y registro de movimientos es una de la más completa y exigente del mundo. Se puso en marcha a partir de 1º de enero de 1998 al publicar el reglamento (CE) 820/97 del consejo. En el cual se establece un sistema de identificación y registro del ganado vacuno mediante marcas auriculares de identificación, base de datos informatizada, pasaporte animal y registros individuales llevados en cada explotación. Por otro lado el etiquetado de productos a base de carne vacuna. Este fue posteriormente derogado y sustituido por el reglamento (CE) 1760-2000.

Del Parlamento Europeo y Consejo que modifica su base jurídica, introduce algunas novedades en cuanto al etiquetado de carne. En el reglamento (CE) N° 178/2002 se estable los principios y requisitos de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativo en cuanto a la seguridad alimentaria (Green, 2007)

La normativa tiene carácter horizontal por que es para todos los productores, y vertical al aplicarse para grupos específicos (en cuanto a la trazabilidad afectan a los siguientes productos; la carne leche y productos lácteos, la pesca y sus productos, los huevos y los productos modificados genéticamente) (Green, 2007).

En otros puntos del mundo como ser Canadá desde el año 1990 se creaba el Consejo Consultivo Nacional para Identificación de Animales orientado al a sistema de identificación electrónica de animales. En 1998 el sector privado participa con el Estado para crear la agencia canadiense de identificación bovina, destinado a elaborar el programa canadiense de identificación. En 1999 se financia la base de datos para la identificación nacional de animales. En el 2001 se crea el programa canadiense de identificación de animales para trazar y eliminar fuentes de enfermedades.

En Estados Unidos a partir del 2003 se comienza a implementar un Sistema de Identificación Animal, con el siguiente calendario;

-julio 2005 sistema de atribución de números de identificación.

-abril 2007 registro de sitios y de animales.

-enero 2008 identificación de sitios y de animales obligatorio.

-enero 2009 obligación de declaración de movimiento de animales (Green, 2007).

Australia como sistema de identificación utilizan la doble caravana: una es la de origen, que acompaña al animal durante toda su vida; y otra es de transacción. El sistema de trazabilidad en Australia es financiado por los productores y la industria a través de la Asociación Ganadera de Australia, entidad que se financia con fondos provenientes de impuestos pagados por los ganaderos. El sistema de trazabilidad implementado en ese país dio origen al NLIS (National Livestock Identification System) (Green, 2007).

Nueva Zelanda tiene absolutamente extendido el uso de caravanas plásticas (generalmente escritas a mano), con fines organizativos, de manejo del rodeo y comerciales, pero no sanitarios, dado que la situación sanitaria en Nueva Zelanda es excelente. Se trata de caravanas auriculares, plásticas o metálicas. Se han llevado a cabo experiencias para que esa caravana secundaria incluya un dispositivo de radiofrecuencia y se desechó la posibilidad de dispositivos subcutáneos a la par que se realizan estudios sobre técnicas de identificación por ADN. Hace ya algunos años comenzó un programa de identificación animal obligatorio, dividido en cuatro fases: uso de códigos identificatorios; uso de caravanas oficiales con códigos únicos e irrepetibles; procesamiento de datos e información, intercambio de información con organismos sanitarios y asociaciones

de productores. En Nueva Zelanda el costo del programa de identificación pesa sobre los productores. Esa circunstancia, sumada a la falta de problemas sanitarios, determina que a pesar de ser un importante productor de carne a nivel internacional, no sea uno de los países más avanzados en materia de identificación y trazabilidad (Garrido, 2006).

En Brasil se ha implementado el Sistema Brasileño de Identificación y Certificación de Origen Bovino (SISBOV) que intenta: identificar, registrar y monitorear individualmente todos los bovinos nacidos en Brasil e importados. Los procedimientos que en consecuencia se adopten deben ser previamente aprobados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAPA) de Brasil. Esta normativa se aplica en todo el territorio nacional mediante dispositivos internos o externos que permitan la identificación y el monitoreo individual de los animales, aprobados y autorizados por MAPA.

Esos dispositivos complementan el Documento de Identificación individual que acompañará al animal durante toda su vida, desde el nacimiento registrando los movimientos resultantes de transferencias o sacrificios. La Base de Datos es de naturaleza oficial (Garrido, 2006).

En Argentina a partir de enero del 2007 se adoptó la sugerencia de la Comisión Nacional Asesora de Trazabilidad, en el sentido de extender la identificación a todo el rodeo, sin limitarla a la hacienda destinada a exportación.

Se han realizado experiencias interesantes, como la llevada a cabo en el centro y norte de Santa Fe, por el proyecto Trazar. Se identificó a más de 50.000 animales pertenecientes a 50 establecimientos, mediante caravana botón con dispositivo de radiofrecuencia en la oreja derecha, complementando la oficial del SENASA. Se utilizó PDA con soft creado al efecto, capaz de registrar las distintas operaciones: nacimientos, pesadas, vacunación, etc. Los datos pasan a incorporarse a una base que puede ser consultada por cada eslabón de la cadena productiva y por el mismo consumidor desde la web (Garrido, 2006).



4.1.4 Trazabilidad en nuestro país

El Uruguay exporta 400.000 toneladas de carne bovina, lo que se corresponde con más del 73% de lo faenado anualmente, siendo por tanto un país dependiente de los mercados exteriores en este rubro, (Peyrou. J, 2008) lo que aproximadamente se corresponde con un 17,5% del total de ingresos que el país percibe por exportaciones (Dirección Estadísticas Agropecuarias D.I.E.A., 2007).

La exportación de carnes en los últimos dos décadas a tenido una marcada tendencia al alza tanto en volúmenes como en relación a los ingresos creados lo que se puede apreciar en la figura II.

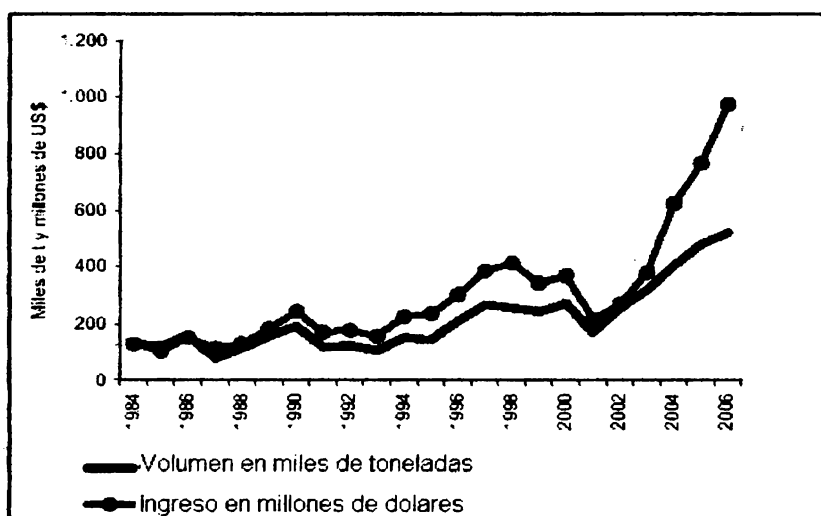


Figura II: Evolución de las exportaciones de Uruguay en los últimos años¹.

La producción ganadera nacional se distribuye por todo nuestro territorio abarcando aproximadamente un 87% de la superficie nacional, ocupando al 10% de la población económicamente activa. Se cuenta con un stock año vacuno de 12,2 millones de cabezas. El stock vacuno del país ha permanecido relativamente estable en la década de los '90 en el entorno de las 10,5 millones de cabezas. (I.N.A.C., 2006)

Por lo tanto en un país en el que el sector cárnico es esencial para su economía, la trazabilidad es fundamental para mantener las exigencia de los mercados importadores, especialmente si consideramos los flujos de hacienda

¹ Fuente: Peyrou J. 2006

dentro del sector productivo que presentan diversas alternativas previo a la faena, lo que dificulta su rastreo (Figura III).

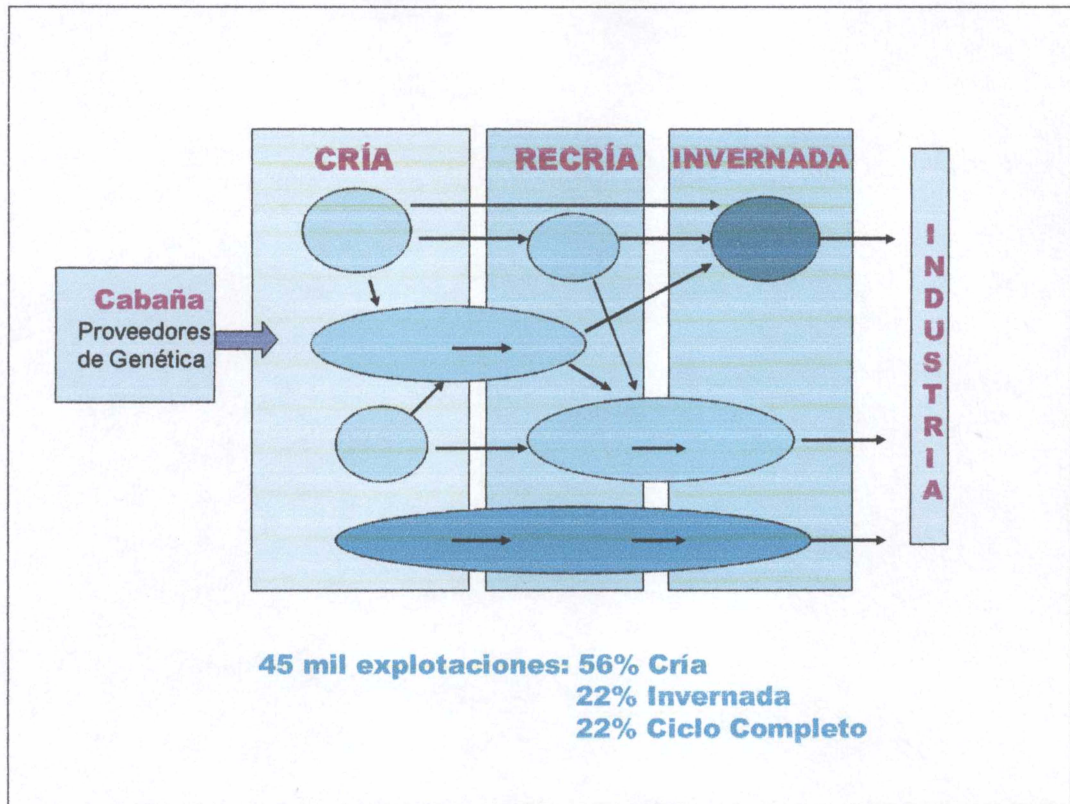


Figura III: Flujos de Hacienda en la Cadena Cárnica Bovina (10).

Por otro lado en Uruguay existen diversas formas de producción, motivo que resalta la importancia de que se cuente con un buen sistema de identificación y seguimiento de los movimientos de los animales. Los sistemas de producción ganaderos se caracterizan por tres sub-sectores, de cría, recría e invernada. Sin embargo, se constatan diferentes opciones u orientaciones cuando se analiza la información predial por establecimiento, existiendo productores especializados en cada etapa y otros que realizan una combinación de actividades (criador-recriador, recriador-invernador y ciclo completo (I.N.A.C, 2006). La identificación adecuada permitiría la identificación individual de los animales frente diferentes movimientos (o sitios) y tratamientos que recibieran los mismos, además de mejorar el manejo de información (computarizada) sin perder el rastro de cada animal.

4.1.4.1 Antecedentes

Formando parte de los antecedentes en base a la información consultada se elabora un análisis FODA (fortalezas, debilidades, oportunidades y amenazas),

como manera de destacar algunos aspectos en cuanto a la aplicación de un programa nacional de trazabilidad. En el mismo se establecen las fortalezas como los aspectos positivos internos al proyecto y como contraposición se presentan las debilidades como características negativas a superar. En referencia al medio externo (o entorno) se analizan las oportunidades (positivas) y las posibles amenazas para el sistema que se está implantando en Uruguay.

4.1.4.1.1 Fortalezas

- Se lograría una mejora en los mecanismos de fiscalización de los flujos de haciendas entre los establecimientos, con o sin cambio de propiedad de los animales, que se encuentra en una fase de transición desde el registro grupal (DI.CO.SE. y Sanidad Animal) a un sistema de identificación individual.
- Es una herramienta que colabora con la gestión de los establecimientos ganaderos, ya que permite almacenar toda la información de un mismo animal de forma irrepetible a nivel mundial. Además la información se continúa en el resto de la cadena de producción. Este aspecto tiene que ver con la responsabilidad de cada agente en el suministro de datos a los organismos competentes y al derecho generado sobre la disponibilidad de la información a lo largo de la cadena.
- Mejora la gestión productiva de los establecimientos agropecuarios (ganancia de pesos, control de movimientos internos, aplicación de vacunas, aspectos reproductivos, etc) (S.I.R.A, 2007).
- Mejora el control del contrabando y el abigeato (S.I.R.A, 2007).
- Mejora el control y erradicación de enfermedades (S.I.R.A, 2007).
- Mejora en control e identificación de las causas de hallazgos de residuos químicos o biológicos en productos pecuarios (S.I.R.A, 2007).
- Respalda los Programas de Aseguramiento de la Calidad (Carne Orgánica,

posibilitaría la obtención de un mayor valor agregado al producto en mercados más exigentes. Para que dicha diferenciación se convierta en una oportunidad para todos los actores de la cadena cárnica, debería existir una distribución de ganancias que superen los costos que para cada sector que la integra (distribución más equitativa).

- La existencia de un mercado con tendencias crecientes a la búsqueda de productos saludables y que además garanticen su inocuidad, esta herramienta puede mejorar las alternativas comerciales de la carne vacuna.
- Según Tomas (2005) la estrategia a ser aplicada son el uso de metodologías internacionalmente recomendadas al producto desde el campo al plato como: análisis de riesgo, técnicas de trazabilidad, armonización de los estándares de seguridad alimentaria, aplicación del principio de equivalencia en los sistemas usados y medidas de control de los peligros.
- Permite posicionar a Uruguay como un abastecedor confiable de carne bovina al mundo, respondiendo a las nuevas exigencias de los mercados.

4.1.4.1.3 Debilidades

- En el caso de Uruguay el sector productor generalmente no tiene incidencia en los negocios de comercialización de carne, tampoco existe niveles de integración con la industria que sean significativos. Por eso hasta el momento los esfuerzos realizados por el sector productor a través de diferentes experiencias piloto para la diferenciación de carnes, no le han significado valor agregado a su producto y sí han implicado aumento de costos.
- El sistema para brindar transparencia en referencia a la provisión de alimentos de calidad, inocuos y nutritivos, deberán estar implicados todos los actores que integran la cadena cárnica, como el productor, las plantas procesadoras, la comercialización y el consumidor (Tomas, 2005).
- Las caravanas en nuestro país se obtuvieron mediante licitación la cual efectuó el SIRA, en esta se compraron dos millones de caravanasa un costo estimado entre 7 u 8 millones de dólares siendo esta compra en el entorno de un 20% de menor valor que la anterior. Siendo el costo estimado por dispositivo cercano a los 4 dólares (Magallanes, 2008).
- Los establecimientos de faena deberán contar con equipos y sistemas que permitan el control electrónico de la faena, teniendo como objetivo



organizar un programa de información electrónica de control que registre automáticamente y transmita en tiempo real los datos al I.N.A.C. Recientemente se está implantando las cajas negras que constan de: balanzas digitales, computadores y otros dispositivos que permitan compilar el pesaje e identificación de los animales desde su ingreso al establecimiento de faena hasta que se transforman en cortes de carne (Bianco y Chiappe, 2005).

- Otra debilidad presente actualmente se refiere a la falta de representación del Uruguay en el comité del CODEX encargado de la discusión de los temas de inocuidad alimentaria mundial.

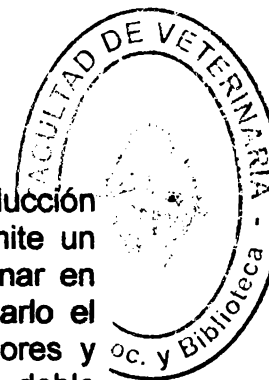
4.1.4.1.4 Amenazas

- Perdida de la identificación de un animal por extravío del dispositivo, lo que hace perder su rastreo.
- Se requiere de un sistema de auditoria que brinde seguridad sobre el desempeño del sistema a nivel de cada país, entre otras funciones.

4.1.4.2 Antecedentes a la trazabilidad electrónica de nuestro país

El contralor de estos movimientos de los animales los realizaba DICOSE (Dirección de Contralor de Semovientes) desde 1973. El que tiene como objetivos asegurar el suministro de información y la calidad de la misma, a fin de garantizar su utilización y disponibilidad por parte del las dependencia de los Servicios ganaderos del MGAP y de los operadores del sistema productivo nacional. Sus funciones son principalmente registrar y controlar la propiedad y existencia de semovientes en establecimientos y en tránsito. Contando con un registro grupal obligatorio constituido por una declaración jurada anual efectuada por propietarios de ganado y declaraciones adicionales para registrar cambios de propiedad y localización de los animales. Desde la fecha de su creación el sistema ha tenido modificaciones no sustanciales (Duran, 2003). Por lo tanto los registros realizados por DI.CO.SE. son en forma grupal o por tropa, se basaba en sus propios registros, marca a fuego, guías de propiedad y el tránsito eran acreditadas por el veterinario oficial y/o veterinario particular. Este control permite ir desde el animal faenado hasta el establecimiento de origen

Como contexto de aplicación de este tipo de tecnología, el Uruguay en el 2002 se promovió una mejora en el sistema de identificación y registro a través del S.N.I.G.(Sistema Nacional de Identificación Ganadero) para consolidar y optimizar



el sistema de trazabilidad grupal llevado por DI.CO.SE. Permitiendo la introducción gradual y voluntaria de un programa de trazabilidad individual, que permite un registro del "animal identificado oficialmente". El SNIG comenzó a funcionar en junio de 2004, el cual no tenía carácter de obligatorio. Para instrumentarlo el M.G.A.P. a partir de octubre del 2003 ha adquirido dispositivos aplicadores y lectores para identificación individual del ganado bovino y se optó por un doble dispositivo de identificación, uno de los cuales permite la identificación visual mediante una caravana y el otro componente debe poseer un dispositivo de radiofrecuencia (Duran, 2003).

A continuación se describen el Rol de los agentes que intervinieron en la cadena en la implantación del proceso de trazabilidad para el S.N.I.G. (Sienra 2006).

Productores: En el Sistema identificación individual, se inscriben voluntariamente en un registro en el MGAP, y compran caravanas subsidiadas e identifican su ganado AÑO. En el sistema obligatorio grupal, tienen un registro individual DICOSE, y realizan cambios de propiedad y movimientos a través de una guía de propiedad y tránsito, además de realizar una declaración jurada de existencias animales y de sus predios al 30 de junio de cada año.

Estado: A través de DICOSE controla todos los movimientos y propiedad de semovientes. En SNIG controla los movimientos en forma individual.

Industria: Maneja la información que recibe de los transportistas y la vuelca en su sistema de producción. En el caso del plan piloto de Trazabilidad individual la información se pierde al ingreso de la faena continuando con una información de lote. En el caso de la información grupal sucede lo mismo. Toda la información se vuelca al DICOSE y a INAC.

Consumidores: Los consumidores nacionales no tienen ningún rol protagónico en la cadena productiva, se establece de hecho la calidad del producto por los controles oficiales. A los consumidores extranjeros les llega el producto a través de compradores, acopiadores. Las exigencias de cada país importador marcan la pauta de confianza del producto, en base a regulaciones, realizando auditorías internacionales de nuestros procesos productivos e industriales.

El SNIG y DICOSE ambos sistemas no se complementaban entre sí, ni eran sustitutos uno de otro ya que el Sistema DICOSE es obligatorio para todos los productores, mientras los productores que participan del SNIG deben cumplir también con DICOSE.

En resumen en el 2002 el MGAP a través del (SNIG) permitió consolidar y optimizar el sistema de trazabilidad grupal e iniciar una fase piloto individual a

través de caravanas electrónicas; siendo uno de los primeros países del mundo al contar con esta tecnología y acceder a mercados como la Unión Europea (Piperno y Oliveira, 2005).

4.1.4.3 Trazabilidad electrónica en Uruguay

Actualmente en el Uruguay se esta desarrollando un sistema de trazabilidad electrónica en la cadena cárnica a partir de la ley 17997 aprobada el 2 de Agosto de 2006.

En particular, el gobierno está impulsando a través de esta ley el S.I.R.A., cuya finalidad es crear la trazabilidad de los productos de origen animal en el territorio nacional.

Los cometidos del S.I.R.A. son:

- Asignación de códigos a los dispositivos de identificación individual oficial.
- Capacitación en los procedimientos del sistema.
- Inspección del funcionamiento del sistema
- Control de calidad de los procedimientos.
- Control de calidad en campo de los dispositivos de identificación individual oficiales.
- Gestión del registro de agentes habilitados.
- Gestión del registro de lectores autorizados para los servicios de lectura del sistema.
- Gestión de la información y permisos para la generación de reportes.
- Elaboración de informes de situación y una edición anual de las características de la ganadería en Uruguay
- Planificación de su estructura.

Actualmente se esta instrumentando:

- Por parte del S.I.R.A. dentro del MGAP, la primera etapa, comprendida entre el 1º de septiembre del año 2006 y el 30 de marzo del 2010, donde tendrá lugar el inicio de la segunda etapa. En esta etapa se determina la obligación de identificar a todo ternero nacido dentro del territorio nacional dentro de sus primeros seis meses de vida, (Sienra, 2006)
- A partir de abril del 2010 comenzará la segunda etapa, la cual permitiría consolidar el sistema de monitoreo en el cual a partir de esta fecha todos los bovinos del país deberán necesariamente estar identificados electrónicamente.

La trazabilidad individual en la cadena cárnica bovina se realiza en dos fases:

1.- El registro de los sucesos que van desde el nacimiento del ternero hasta el ingreso del animal al frigorífico que comprende el S.I.R.A.

2.- El registro de los sucesos que ocurren desde la faena del animal hasta la obtención del producto cárnico a ser comercializado por el consumidor final esta en fase de implementación. (Sienra, 2006).

4.2 TRAZABILIDAD POR DNA: MARCADORES MOLECULARES

La trazabilidad por DNA, se realiza mediante marcadores moleculares del DNA, que se incluyen en los marcadores genéticos (MG).

Los marcadores genéticos son locus o alelos cuyo fenotipo proporciona información acerca de un cromosoma o un segmento de un cromosoma durante el análisis genético (Tamarin, 1996). El estudio y desarrollo de las técnicas utilizadas para la detección de dichos polimorfismos, han sido estandarizadas en diferentes Laboratorios. Las mismas están avaladas por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) mediante el test de Comparación Internacional que bianualmente se realiza entre todos los laboratorios que trabajan en dicha área y que son sus miembros institucionales (Kelly, 2005).

Los MG utilizados con este fin han sido seleccionados en base a las siguientes características:

- estar controlados por mecanismos de herencia mendeliana simple,
- ser polimórficos,
- ser estables durante toda la vida del individuo,
- poder ser analizados por técnicas reproducibles, fiables y precisas,
- no estén ligados (Aranguren y col, 2005).

Los tipos de marcadores utilizados actualmente para la identificación individual son microsatélites.

Los alelos que controlan los microsatélites son codominantes y por lo tanto se determina el genotipo de un individuo.

Un buen marcador molecular para estudios genéticos debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad, entre ellas, debe tener una buena distribución a lo largo del genoma y alto grado de polimorfismo. La técnica para analizar el marcador debe ser rápida, práctica y debe repetirse con fiabilidad en otros laboratorios (Aranguren y col, 2005).

Existen tres tipos de marcadores moleculares, los cuales se clasifican como: marcadores tipo I, tipo II y tipo III.

4.2.1 Marcadores Tipo I

Los marcadores del tipo I son los loci que codifican para genes muy conservados en mamíferos, son poco polimorficos, la mayoría tienen dos alelos, son utilizados para la construcción *de mapas comparativos entre especies relacionadas*.

4.2.2 Marcadores Tipo II

Se caracteriza por presentar loci altamente polimorficos, cuyas secuencias no siempre están conservadas entre las especies, denominados microsatélites (MS) siendo útiles además para mapeos genéticos pues están dispersos en el genoma. De acuerdo a su longitud se forman diferentes variantes (alelos) del MS en una raza. Cada individuo va a heredar uno del padre y otro de la madre (Bowling, 1994).

4.2.2.1 Estructura de los Microsatélites

Los MS son marcadores moleculares constituidos por DNA, que se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos de forma aleatoria y uniforme. Son fragmentos cortos de nucleótidos repetidos, cuya secuencia repetida, por ejemplo puede ser: TGTGTGTG.... que varían en su longitud según el número de repeticiones (TG). Son secuencias cortas (2 a 6 pb) de DNA repetido (n veces) ordenados en tándem. Los MS más frecuentes son los dinucleótidos, como por ejemplo, TG repetidos (poli (TG)n donde n es el número de repeticiones de dinucleótidos. Los MS seleccionados para ser usados como MG generalmente tienen un n mayor de 10 pero menor de 30 ya que son los que presentan un buen grado de polimorfismo y son estables (Aranguren y col, 2005; Moxon y Willis, 1999). El polimorfismo se debe a la proclividad a equivocarse de la enzima DNA polimerasa en la replicación del DNA; la que comete un error: desajuste por deslizamiento entre las secuencias complementarias, luego de la separación de las cadenas de la doble hélice, produciendo eventualmente aumento o disminución de las repeticiones. Éste proceso se puede observar en la figura IV (Moxon y Willis, 1999).

Las mutaciones ocurren como consecuencia de la disminución o aumento de repetidos durante la meiosis y su frecuencia es mucho más alta que la tasa normal, siendo, por generación, de 10^{-2} a 10^{-5} . Según Bowling y col. (1997), si la tasa de mutación es mayor de 10^{-3} no interferiría en su utilización como MG.

El origen y función de los MS aún hoy se encuentra en discusión; se postula que las secuencias repetidas cumplirían una función de regulación génica, “sitios calientes” de recombinación por su alta tasa de mutación, empaquetamiento y condensación del DNA en los cromosomas eucarióticos durante el ciclo celular o quizás están asociados con enfermedades (Aranguren y col, 2005).

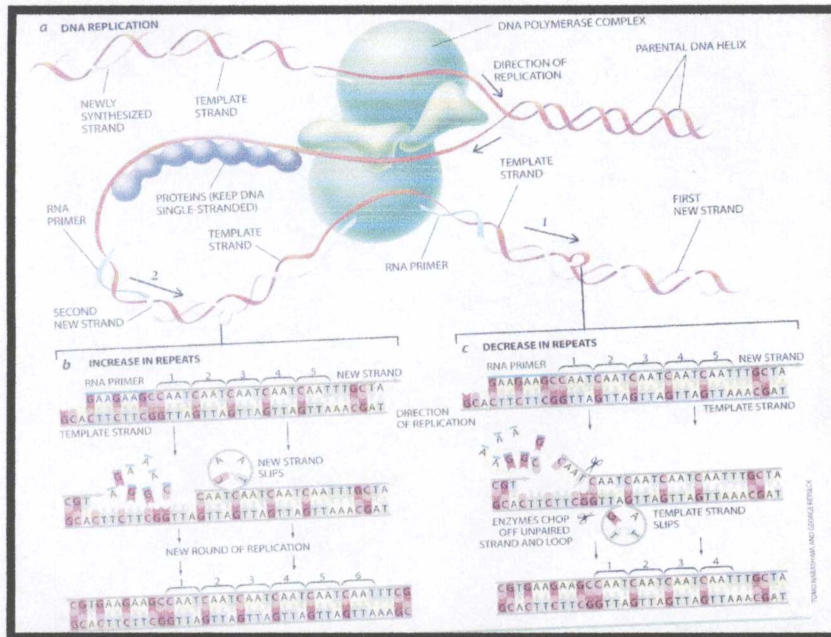


Figura IV: Producción de polimorfismo de los MS mediante deslizamiento de la polimerasa².

4.2.2.2 Características y funciones de los Microsatélites

Las principales características de los MS son:

- a. Ser controlados por mecanismos de herencia mendeliana simple,
- b. ser polimórficos,
- c. ser estables durante toda la vida del individuo,
- d. ser analizados por técnicas reproducibles, fiables y precisas.

Dado su elevado nivel de polimorfismo, resultan útiles para definir un único genotipo multilocus, de particular interés en estudios donde se requiera una escala muy fina de resolución y exactitud. Otros tipos de marcadores presentan algunas

² Fuente: Moxon y Willis 1999

limitaciones, siendo especialmente estos estudios los referidos a: análisis de paternidades, parentescos, asignación de individuos a raza, planificación de apareamientos y otros aspectos de índole reproductiva (servicios múltiples). Debido a particulares ventajas, el uso de microsatélites ha tenido un gran impacto en el estudio de la genética de animales y plantas, desde su descubrimiento en 1989. El análisis de los alelos de microsatélites se detectan como fragmentos específicos de DNA cuya medida de los alelos es en pares de bases (pb) (Aranguren y col, 2005).

Debido a que los microsatélites están distribuidos a lo largo de todo el genoma en los eucariotas: con baja frecuencia en las regiones codificantes, en los telómeros. En estas últimas regiones se ha descrito asociada a enfermedades, sin embargo, aún se desconoce el significado funcional de estas secuencias (Aranguren y col, 2005). Otras de las funciones de los MS adjudicadas son las que actuarían en los procesos de regulación de la información genética.

Por su alto grado de variación, se utiliza la tipificación de DNA para identificación individual, control de parentesco y análisis de poblaciones (Kelly y Postiglioni, 2002).

Presentan como ventajas las siguientes:

- Presentar un alto grado de polimorfismo (varios alelos) que aumenta la exactitud de la identificación individual y el diagnóstico de paternidad;
- Ser muy frecuentes en el genoma (estimándose entre 50 y 100.000) pudiéndose ampliar el número de MS testados para la resolución de casos complejos;
- Estar distribuidos por todo el genoma;
- Presentar herencia simple y ser estables durante toda la vida del individuo;
- Poder ser analizados por técnicas reproducibles, fiables, precisas y automatizables mediante el secuenciador automático;
- No estar limitados a muestras frescas, pudiéndose analizar con muy pequeña cantidad de material biológico y de diversos orígenes (folículo piloso, sangre, semen, músculo etc.) (Kelly y col, 2005).

Estas ventajas permiten que sean utilizarlos para:

- Detectar QTL (Loci de características cuantitativas) y por lo tanto utilizarlos para la investigación de características de producción (Selección asistida por marcadores) de diversos rasgos de interés productivo (carne, leche, resistencia a enfermedades etc.), que están determinados por varios genes;
- Realizar la identificación de los animales a lo largo de toda la cadena cárnica (trazabilidad) y solucionar casos de abigeato;
- Determinar la paternidad en animales de pedigrí y en la resolución de casos donde se realizan servicios múltiples. Este diagnóstico corrobora los

registros genealógicos con gran exactitud y por ende es un aporte a la exactitud de la selección fenotípica realizada por la genética cuantitativa.

- Estudios raciales.

Aparte de ser usados para los test de paternidad, los MS son muy útiles para el mapeo génico, siendo también una herramienta de elección para estudiar su asociación con enfermedades genéticas, mejorar las características de performance (selección asistida por marcadores genéticos: MAS) y la construcción de árboles filogenéticos (Kelly y Postiglioni 2002).

Los MS son recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) para realizar la verificación de parentesco e identificación individual. Por eso a partir del último test de comparación internacional (2001/2002) el ISAG ha resuelto chequear las técnicas de tipificación de DNA, enviando solamente muestras de DNA para ser analizadas con una batería de 9 MS obligatorios para bovinos. Dado que otorga una mayor eficiencia en el diagnóstico de paternidad; además de ser una técnica fiable obteniendo resultados reproducibles (Kelly y Postiglioni 1997).

4.2.2.3 Métodos de análisis: PCR y Separación de Fragmentos

Para efectuar estos estudios, ha sido de gran importancia el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) por Mullis y colaboradores (1986), la cuál es una reacción enzimática catalizada por la DNA polimerasa, que permite la amplificación o reproducción «*in vitro*» de grandes cantidades de una región particular del DNA, a partir de una pequeña cantidad original de DNA molde. Esta enzima requiere, para la síntesis iniciadores o «*primers*», cuyas secuencias son complementarias a la de las regiones flanqueantes 5' y 3' del segmento particular de DNA que es específico del sitio que se quiere amplificar, Según Aranguren y col, (2005).

Como la técnica de separación de fragmentos manual tenemos la electroforesis, la cual previo una amplificación del DNA mediante técnicas de PCR se procede a la evaluación en geles de poliacrilamida (corrida electroforética) (Rincón, 1999). En el cual se observan bandas correspondiendo al tamaño de los fragmentos.

En cuanto a la otra forma de separación automática de fragmento se usa el Secuenciador que nos permite identificar los alelos del genotipo. A continuación se describe brevemente el mecanismo de acción de este equipo (ABI Prism™ 310, 2001).

El software de análisis GeneScan® analiza datos brutos sin clasificar los alelos, sólo cuantifica los fragmentos de DNA y determinar su tamaño a través de las comparaciones con un marcador molecular interno (ROX 350) que contienen fragmentos de tamaño estándar. Tiene la capacidad de leer hasta cuatro colores a la vez (tres fluorocromos marcadores de microsatélites y un marcador de peso molecular) según la matriz utilizada.

Los tubos con las amplificaciones de la muestra son puestos en una bandeja del equipo (Fig. V) la cual contiene un orden específico correspondiente a una planilla generada por la computadora, que es la que permite el análisis automático al ingresarlo en un programa del equipo (GeneScan).

La electroforesis se efectúa a través de un electrodo cátodo con un capilar el cual absorbe el DNA de la muestra amplificada mediante una inyección electroforética, el electrodo ánodo se encuentra sumergido en el otro extremo del capilar en un buffer. La muestra es sometida a electroforesis en el capilar a través de un polímetro y sometido a una corriente se mueve del cátodo hacia el ánodo). Cuando los fragmentos DNA llegan a una ventana de vidrio donde un láser estimula a los fluorocromos, emitiendo rayos UV que activan su fluorescencia, y es registrado y colectado por una cámara digital. El software interpreta el resultado, calculando el tamaño según el marcador de peso molecular haciendo un calculo semilogaritmico y cuantifica el tamaño de los fragmentos (ABI Prism™ 310, 2001).

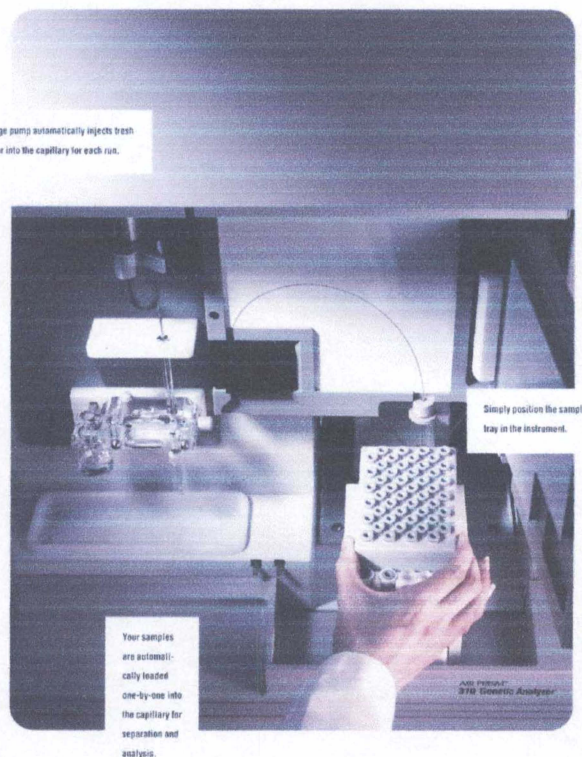


Figura V: Introducción de muestras amplificadas en la placa del Secuenciados (ABI Prism™ 310, 2001).³

Esta tecnología desarrollada presenta las siguientes ventajas con respecto a los métodos tradicionales:

- permite procesar gran cantidad de muestras;
- los resultados son obtenidos con gran precisión pues detecta diferencias moleculares de un par de base y procesa los datos electrónicamente facilitando su interpretación;
- disminuye el costo del análisis al compararse con las técnicas tradicionales o de tipificación de MS manual, pues se analiza una batería de MS simultáneamente (multiplex) con una sola amplificación y una sola técnica;
- mayor exactitud en la identificación individual especialmente en aquellas razas que presenta una menor variabilidad genética que otras, pues al estar los individuos de la población muy emparentados entre sí y compartir los mismos genes se necesita una alta eficiencia de los MG para diferenciar individuos (Bowling, 1994).

4.2.2.4 Aplicaciones de los microsatélites

En cuanto a las aplicaciones tenemos las del punto de vista práctico y aquellas con fines de investigación, que se describen a continuación.

4.2.2.4.1 Identificación Individual y Pruebas de Paternidades

El principio de las pruebas de paternidad utilizando marcadores genéticos consiste en la comparación del genotipo y/o fenotipo de la descendencia con el de sus progenitores. Como principio «mendeliano», uno de los alelos que presenta un individuo proviene del padre y el otro de la madre, estas pruebas tienen un porcentaje de exactitud del 97-99% dependiendo de la raza (Bowling, 1994).

Para seleccionar los marcadores a utilizar, estos deberían reunir las características descritas anteriormente y presentar además: alta variabilidad, herencia estable (baja tasa de mutación), elevada reproductividad y precisión, no poseer alelos «nulos», ser un procedimiento fácil, rápido, económico, potencialmente automatizable, que la información del genotipo pueda ser transferida rápidamente, que la fuente de DNA no esté limitada únicamente a muestras sanguíneas frescas ni a grandes cantidades de DNA y por último, presente una segregación independiente con otros marcadores al ser combinados en la prueba.

³ Fuente: Empresa PE Biosystems, Modelo ABI PRISM 310, 2001. Pe Corporación Business Ca, USA

Anteriormente para estos test se detectaban mediante prueba de exclusión con grupos sanguíneos y polimorfismos proteicos que tenían una probabilidad de de exclusión del padre entre un 84% a un 94%, (Bowling, 1994). Estando limitadas a muestras de sangre fresca, usar diversas técnicas para su determinación y estar limitados al no poder aumentar el número de MG para resolución de casos complejos.

4.2.2.4.2 Mapas Genéticos y Genómica Comparativa

Otra aplicación, de los microsatélites es la construcción de mapas de ligamientos completos y detallados; así como la identificación de regiones cromosómicas con genes de interés denominados loci de características cuantitativas (QTL's). Para ello se requiere, que los alelos se segreguen independientemente y que además puedan ser monitoreados a través del pedigrí. Así, un mapa genético minado de marcadores se convierte en una herramienta muy útil para identificar genes responsables de caracteres de interés. Se trata de buscar asociación (ligamiento) entre alelos con cualquiera de los marcadores que segreguen en poblaciones que presentan dicho carácter productivo, para identificar regiones del genoma donde es más probable que se encuentre el gen responsable de ese carácter (Aranguren y col, 2005). Actualmente existen proyectos internacionales para elaborar mapas genéticos en las principales especies domésticas, los cuales describen varios marcadores de este tipo.

Los MS también se usan para mapeo comparativo mediante la técnica de "silico mapp": es un acercamiento al mapeo genético comparativo utilizando programas informáticos y el banco de DNA genómico, sirve para incrementar el número de genes y la expresión de secuencias identificada secuencias de anclaje. Se aplicaría para comparar regiones de las secuencias de los cebadores (conservadas) de diferentes especies de mamíferos entre distintas especies (Faber y Medrano, 2003)

4.2.2.4.3 Estudios de Genética Poblacional

Representa una de las áreas en donde los microsatélites han sido más ampliamente utilizados, ya que nos permite estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudio es de gran importancia para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la consanguinidad existente en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción. Durante los últimos años se han realizado muchos estudios que han utilizado los microsatélites para análisis filogenéticos, concluyendo que, con un buen número de loci analizados y

con apropiadas tasas de mutación, los microsatélites pueden dar una buena aproximación de la filogenia (Aranguren y col, 2005).

4.2.2.4.4 Trazabilidad

Para apoyar el sistema de la trazabilidad de la carne se podría realizar a futuro en un porcentaje de la población el análisis de DNA que permitiría certificar su origen hasta el consumidor, determinando puntos de riesgo especialmente durante la pérdida de identificación de la caravana en el frigorífico y posteriormente en los cortes (códigos de barra). Esta técnica proporciona una gran fiabilidad a lo largo de la cadena cárnica, garantizando el origen y procesos ocurridos durante la obtención del producto que se consume. La utilidad del análisis de DNA permitiría reafirmar los métodos de trazabilidad electrónica utilizados en la producción ganadera que se están implementando en Uruguay desde el 2004 y ser un certificado de origen de nuestras carnes bovinas. (Ghirardi, J. y col., 2007, Felmer. R. y col., 2006)

Además se podría extracción de pelo del ternero al ser caravaneado y guardado en un sobre por dos años en una institución estatal y cuando se detecte algún evento sanitario o por solicitud del consumidor sea rastreada la muestra y confirmada o no su identidad mediante el análisis de DNA. Lo que aportaría un sistema que permitiría controlar fehacientemente el sistema de identificación electrónica, garantizando al consumidor el mantenimiento de la misma.

4.2.3 Marcadores Tipo III

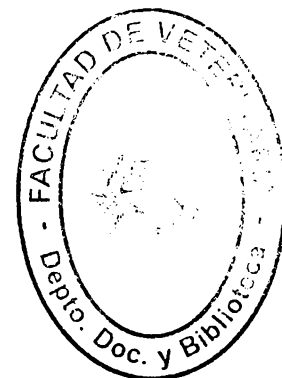
Dentro de esta clase tenemos los SNP (polimorfismos de nucleótidos simple): Son marcadores que producen cambios en un nucleótido por otro en la secuencia de DNA, o sea que sería la posición de una base con secuencias alternativas en el genoma de DNA. Se considera para que sea un SNP, que el alelo menos frecuente debería tener un frecuencia de 1% o mayor. La mayoría de este tipo de polimorfismo presenta sólo dos tipos de alelos (bialélica), y por ello son referidas algunas veces como marcadores bialélicos. Presentan una frecuencia baja de sustitución estimándose entre 1×10^{-9} y 5×10^{-9} de nucleótidos por año en posición neutrales mamífero. La probabilidad de que dos bases independientes cambien en una posición simple es muy baja (Rincón, 2002).

La tendencia en la mutación es la prevaencia de dos tipos de SNP. Los mecanismos de mutación tampoco resultan en transiciones: purina-purina (A-G) o pirimidina- pirimidina (C-T) intercambiando: purina- pirimidina o pirimidina-purina. Con la presencia solamente de dos alelos, la máxima heterocigosidad esperada para cada SNP es de solamente 50%, siendo por lo tanto menos informativo que las regiones satélites de DNA (minisatélites y microsatélites), las cuales generalmente presentan múltiples alelos y sus valores de heterocigosis superan el

70%. En forma general, para la construcción de mapas genéticos a partir de SNP son requeridos hasta 3 veces mas marcadores comparativamente que con los MS (Vignal y col., 2002).

Aunque muchos de los SNP's se localizan en regiones no codificantes, un número importante de estas mutaciones que corresponden a sitios de genes codificantes asociándose a enfermedades u otra expresión fenotípica. Su alta frecuencia en el genoma y su baja tasa de mutación, hacen que se constituyan como elementos deseables para la construcción de mapas genéticos (Aranguren y col, 2005).

El costo estimado del análisis de los microsatélites en bovinos en nuestro país a la escala que esta trabajando (100 a 300 muestras) es de 25 dólares por lectura.



5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

Se utilizó una muestra constituida por 11 animales especie Bovino, subespecie *Bos taurus*, raza Hereford cruzada, categoría terneras, las mismas pertenecen a un rodeo experimental de 40 terneras bolita que I.N.I.A. (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) pertenecientes a un convenio con la C.N.F.R. (Comisión Nacional de Fomento Rural), estas terneras integraban otros experimentos del instituto que financió la investigación realizada.

Los animales se encontraban localizados en la estación experimental de I.N.I.A. Las Brujas, Ruta 48 Km. 10 Departamento de Canelones, en cuyas instalaciones se desarrolló la fase de investigación en su laboratorio biotecnología.

En la estación experimental se identificó a todo el rodeo con doble dispositivo (bolo intraruminal y caravana) la caravana electrónica en la oreja derecha y una caravana visual con el número correspondiente al número chip en la oreja izquierda.

5.2 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

A continuación se detallan los protocolos utilizados para la extracción de las muestras:

- Extracción de pelo:

El 9 de Marzo de 2005 se extrajo pelo con folículo piloso, para ello se arrancó el pelo del mechón de la cola y se guardaron en sobres de papel con la identificación correspondiente (protocolo 1).

Protocolo 1: Extracción de pelo en bovinos.

- a) Se arranca varios pelos de la cola (20 a 30) lo mas limpios posibles y observando que tengan folículo piloso (bulbo).
- b) No contaminar el folículo piloso durante la manipulación. No debe estar contaminado con las manos, ni materias fecales.
- c) Colocar dentro de un sobre de papel, sellarlo y escribir el nombre del animal, el RP o N° de caravana
- d) Conservar a temperatura ambiente.

-Extracción de músculo

Las muestras de músculo se obtuvieron en el frigorífico Solís en las fechas 23 de septiembre y 13 de octubre donde se tomaron por cada media carcasa muestras del músculo del cuello, luego de pasar la segunda balanza.

Protocolo 2: Extracción de músculo en bovinos.

- a) A cada media carcasa se le extrajo una muestra con un peso cercano a 50 gramos.
- b) Para la extracción se utilizan guantes, tijera y pinza de disección.
- c) Entre muestras al instrumental se le efectúa en enjuague en una solución con hipoclorito de sodio al 5%, evitando la contaminación entre muestras.
- d) Las muestras extraídas son colocadas en una bolsita de nylon identificado las mismas con el número ordinal de faena y el correspondiente del chip. Utilizando los colores negro o rojo correspondiendo a cada media carcasa.
- e) Dichas muestras fueron refrigeradas a 5° C (Celsius) hasta su análisis y luego congeladas.

5.3 METODOS DE ANALISIS DE LABORATORIO

Los análisis de laboratorio se realizaron en la Unidad de Biotecnología del I.N.I.A. Las Brujas Ruta 48 Km. 10.

5.3.1 Extracción de DNA

Una vez ingresado las muestras al laboratorio se registraron asignándole el número del laboratorio que es correlativo al ingreso de muestras, como ejemplo 1/06 correspondería a la primera muestra ingresada en el año 2006. Este N° es el que se utiliza dentro del mismo hasta el momento de la emisión de los resultados. Se lleva doble registro en cuaderno de entrada y en archivos Excel donde esta la ubicación de la muestra conservada.

A continuación se detallan los protocolos utilizados para la extracción de DNA de pelo y músculo.

Protocolo 3: extracción de DNA a partir de folículos pilosos.

- a) Se tomaron con pinza entre 5 a 8 pelos con bulbo piloso, dependiendo del tamaño de los mismos.
- b) Se cortaron los pelos próximos al bulbo, descartando el resto del pelo. Tanto la pinza como la tijera se limpian entre muestras con hipoclorito de Na al 5%.
- c) Estos se colocaron en tubos eppendorf de 0,5 ml rotulados con el número de laboratorio.
- d) Se colocaron 100 µl de Buffer de lisis de pelo; Formado por: Buffer Stock (Tween 20, Buffer 10 × de PCR (sin magnesio), MgCl₂ 25mM agua MQ hasta completar 50ml) y 0,5 µl de proteinasa K Fermentas® (20mg/ml) se le añade antes de su uso.
- e) Incubar los bulbos a 60 °C durante 45 minutos y desnaturalizar la proteinasa K a 95° C. por 45 minutos, en Termociclador (Marca Techne, modelo Genius, procedencia Inglaterra).
- f) Usar 2 a 4 µl de muestra de DNA de pelo para la reacción de PCR.
- g) Almacenar en refrigerador a 4° C.

Protocolo 4: Extracción de DNA de músculo

- a) Se pesan 300 mg de músculo en balanza.
- b) Mezclar la muestra de músculo en 5 ml de Buffer de lisis (Tris 50nM, pH 8, EDTA 20nM, 5% SDS) y Proteinasa K (20 mg/ml), a 37 °C toda la noche agitando gentilmente incubándolo en una estufa (marca Hybair, modelo Mini oven, USA.).
- c) Extraer 500 ul del lisado y realizar la extracción con 250 μ l de fenocloroformo isoamílico. Agitar y extraer el sobrenadante (sin centrifugar) a otro tubo.
- d) Precipitar el DNA genómico con 50 μ l de NaCl. 2 M y 900 ul de etanol absoluto.
- e) Centrifugar a 13000 RPM por 10 minutos, tirar el sobrenadante sin que caiga el pellet. Centrifuga (marca Heraeus, modelo Biofuge pico).
- f) Lavar el pellet de DNA con 500 μ l de etanol 70%. Dejar escurriendo el alcohol por 10 minutos.
- g) Resuspender el pellet en 50 μ l de agua de MQ (ultra pura) y 2 μ l de RNasa (10 mg/ml), dejar toda la noche el pellet para su disolución y para que actúe la enzima y elimine los RNAm de las proteínas del músculo.
- h) Evaluar el DNA en gel de azarosa y/o espectrofotometro.

2 Evaluación del DNA

La valoración del DNA se efectuó mediante una corrida electroforética en de agarosa.

Protocolo 6: Evaluación de DNA genómico (alto peso molecular).

- a) Se disuelve 0,8 gr de agarosa (Sigma A9539, ICN 00668) en Buffer TAE 1X hasta completar los 100 ml buffer (500 ml de agua destilada y 10 ml de Buffer 50X). Preparación del Tae 50X: TRIS base 242gr, Acido Acético Glacial 57,1ml, EDTA 0.5M (pH 8.0) 100ml y H₂O destilada hasta completar 1000 ml.
 - b) Calentar y agitar hasta que la agarosa se disuelva bien en un microonda.
 - c) Una vez tibio volcar la solución en el molde de la cuba de electroforesis con los peines, verificando que no queden burbujas.
 - d) Se deja enfriar, se quitan los peines y se introduce en el molde de la cuba de electroforesis (Marca CosmoBio Co. Ltd, modelo i-Mupid.j, origen Japón), sumergiéndolo en el buffer TAE 1x.
 - e) Luego se le coloca 2 µl de muestras de DNA en cada pocillo con buffer de carga 6x (0,25% bromophenol blue, 0,25% xylene cyanol FF y 40% sucrose en agua).
 - f) En el ultimo pocillo la muestra control de DNA (50ngr/ul). Esta muestra nos permite determinar si es DNA de alto peso molecular, la concentración y las condiciones.
 - g) Se corre a 100 volt durante 20 min.
 - h) Se tiñe el gel sumergiéndolo en buffer TAE 1x con bromuro de etidio durante 15 a 20 min.
 - i) Se lee a través un transiluminador (marca Dinco & Rhenium, modelo Transilumineitor, USA) y se le toma una foto.
-

5.3.3 Amplificación del DNA

Se realiza un múltiplex que es la amplificación simultánea de los 9 microsatélites (STR), el mismo es un kit de desarrollo nacional realizado en el INIA (KIT-INIA) (Kelly y col. 2005), cuyo diseño experimental se realizará transferencia tecnológica a empresas.

Básicamente el protocolo esta constituido con los 9 MS bovinos que son obligatorios según las normas de la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG), cada uno marcado con un fluorocromo: FAM de color azul que se utiliza para los siguientes: TGLA227; BM2113; ETH10; SPS115. El fluorocromo HEX (verde), en los siguientes microsatélites: TGLA126; TGLA122; INRA023. Por último es TAMRA de color amarillo para los microsatélites ETH225; BM1824.

Los cebadores (primers) se observan en el cuadro I

Cuadro I.- Cebadores: Forward (F), Reverse (R) de los 9 MS bovinos del Kit-INIA de la Unidad de Biotecnología.

MS	Cebadores*		Cita Bibliográfica
	FORWARD	REVERSE	
BM1824	GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC	CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG	Bishop y col. 1994
BM2113	GCT GCC TTC TAC CAA ATA CCC	CTT CCT GAG AGA AGC AAC ACC	Sunden y col. 1993
INRA023	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC	TAACTACAGGGT GTT AGA TGA ACT C	Vaiman D. y col. 1994
ETH10	GTTCAGGACTGG CCC TGC TAA CA	CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC	Solinas Toldo. col. 1993
ETH225	GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T	ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT	Steffen y col.1993
SPS115	AAA GTG ACA CAA CAG CTTCTCCAG	AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG	I.S.A.G
TGLA122	CCC TCC TCC AGG TAA ATC AGC	AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA	Kappes y col. 1997
TGLA126	GTA ATT TAG AAT GAG AGA GGCTTCT	TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	I.S.A.G
TGLA227	CGA ATTCCAATCTGTTAATTTGCT	ACA GAC AGA AAC TCA ATG AAA GCA	Kappes y col. 1997

*A: Adenina, C: Citosina, G: Guanina, T: Timina.

La amplificación en multiplex con 9 MS obligatorios por el ISAG del KIT-INIA se describe en el protocolo N° 7

Protocolo 7: Amplificación del DNA por PCR-múltiplex

- a) Se realiza un múltiplex con el Kit-INIA constituido básicamente por un MIX de PCR con:
- Cloruro de Magnesio
 - dNTP's (Fermentas®)
 - Buffer 10X (Fermentas®)
 - Dieciocho cebadores (forward y reverse) de los 9 microsatélite (tabla II) marcados con fluorocromo (Alfa-DNA®)
 - HotStar DNA polimerasa (Fermentas®)
 - Agua MQ (ultra pura).
- b) Se rotulan tubos eppendorf de 200 µl con el N° de análisis. Se de adiciona 13 µl del Mix de PCR a cada tubo rotulado y luego 2 µl de DNA de pelo o músculo. Obteniéndose un volumen final de 15 µl total en cada tubo.
- c) Se centrifugan 10" y se colocan en un Termociclador (marca Techne, Modelo genius, procedencia Inglaterra)
- d) Se programan los ciclos para la técnica de PCR para amplificación de DNA bovino, la cual sigue los siguientes pasos:
- 1- Desnaturalización a 95° C durante 10 minutos;
 - 2- 31 Ciclos de - Desnaturalización: 94° C por 45 segundos;
 - Hibridación de primers con el DNA blanco a 61° C durante 45 segundos,
 - Extensión a 72° C por 60 segundos.
 - 3- Una última etapa de extensión de 72° C durante 60 minutos.
- c) Se almacena a -20° C.

Luego de amplificadas las muestras se corren en el secuenciador automático ABI 310 (ver protocolo 8).

Protocolo 8: Preparación de muestras para el Secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems, modelo 310 Genetic Analyzer, procedencia USA)

- a) Calentar la placa del equipo a 60° C mientras se preparan las muestras.
- b) En tubos eppendorff de 200 µl se coloca 11.5 µl de formamida ultrapura con 0.5 µl Gene Scan 500 ROX Size Standard (medidor de peso molecular).
- c) A la mezcla se le adiciona 1 µl del producto amplificado de cada muestra a ser analizada, cuidando mantener el orden que se ingresó en el Sample Sheet (programa del secuenciador) con la ubicación de cada una de las mismas. A su vez se introduce una muestra control de la ISAG para estandarizar la lectura en pares de bases.
- d) Se inicia la corrida electroforética automática la cual se realiza a en 15 volt y a una temperatura de 55° C.
- e) Verificar que efectivamente se este analizando los fragmentos por en el programa GENSCAN del Secuenciador.

5.4 MÉTODO DE ANÁLISIS DE DATOS

5.4.1 Lectura de los datos del Secuenciador

Los valores recolectados por el GENSCAN durante la corrida de las muestras en el secuenciador son llevados a otro programa Genotyper®3.7 (NT Software, procedencia USA), donde se observan los electroferogramas según el rango de pares de bases de los diferentes MS (cuadro II).

Cuadro II.- MS que integran el KIT_INIA con su rango de peso molecular y fluorocromo

MS	Rango de peso molecular	Fluorocromo
BM1824	164-212	TAMRA
INRA023	187-229	TAMRA
ETH225	129-159	TAMRA
TGLA227	59-109	FAM
BM2113	110-140	FAM
ETH10	182-228	FAM
SPS115	229-259	FAM
TGLA126	99-125	HEX
TGLA122	129-187	HEX

En las figuras VII, VIII y IX se observa electroferogramas en el cual se encuentra el pico correspondiente a los pares de bases del alelo de un determinado MS de acuerdo al color y el largo de pares de bases.

En base al rango de variación que presenta cada microsatélite (polimorfismo) es lo que nos permite identificar a cada individuo con una certeza cercana al 100% utilizando solamente 9 microsatélites.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

De acuerdo al protocolo presentado y aprobado por la Comisión de Tesis de Grado, se proponía comparar ambas tipificaciones de DNA (pelo y músculo) de cada animal y se calcularía el porcentaje de coincidencia entre si. Además se compararía dicha identificación con los otros identificadores electrónicos y número ordinal generado por el Frigorífico luego de la segunda balanza mediante el método de Chi cuadrado de contingencia o el método de MODECOD (SAS). Dichos métodos no han sido aplicados debido a los resultados obtenidos. En cambio se evaluó la eficiencia del Kit DNA como identificador individual de las muestras, determinándose el grado de polimorfismo de los microsatélites obtenidos en el presente ensayo obtenido mediante el Índice de heterocogocidad en la población estudiada.

El índice de heterocigocidad individual se corresponde con $1 - \sum (p_i^2)$. Siendo p_i la frecuencia génica.

Índice de heterocigocidad global es el promedio del índice de heterocigocidad individual de todos los MS. Es un indicador de índice de polimorfismo existente.

6 RESULTADOS

A continuación se presentan los geles con los resultados de la extracción de DNA de pelo (Fig. VI) y de músculo (Fig. VII).

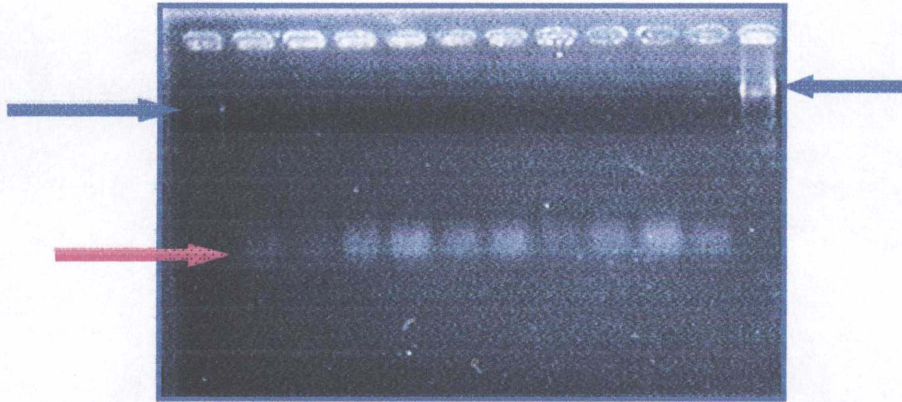


Figura VI: Corrida electroforética del DNA obtenido de pelo se indica con la flecha roja, que señala el DNA correspondiente a las terneras. Este DNA resultó de bajo peso molecular por estar fragmentado. En cambio los controles de DNA que fue extraído de sangre (en el pocillo 1 y 12) señalados con flechas azules son de mejor calidad al presentar alto peso molecular (sin fragmentarse).

Como se observa el DNA de pelo es de menor calidad por su bajo peso molecular y difuso lo que indica que está degradado. En cambio los controles 1 y 12 tienen alto peso molecular y diferentes concentraciones. Sin embargo las muestras de DNA de pelo amplificaron los 9 MS como se puede ver en el cuadro III y en la figuras de los electroferogramas.

En la Fig. VII se muestra la corrida electroforética del DNA de músculo, en la cual se aprecian las bandas en todos los carriles y además se visualizan las bandas del marcador de peso molecular y la muestra control 4143. Se observa que el músculo dio DNA de alto peso molecular como el control y de gran cantidad dada la intensidad presentada.

En el cuadro III se constata que amplificaron todas estas muestras de DNA, y los electroferogramas.

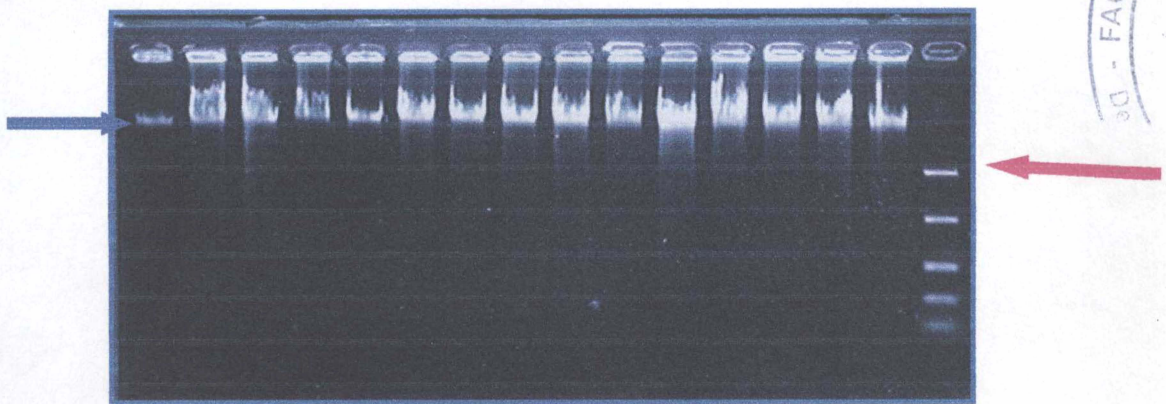


Figura VII: Corrida electroforética del DNA de músculo de las siguientes muestras: Control de DNA 4143, A6, B6, A9, B9, A12, A16, B16, A17, B17, A166, A167, A168, A169, A170 y el marcador de peso molecular FastRuller™ DNA Ladder, Mídele Range, dando la primer banda a los 5000 pares de bases (de izquierda a derecha respectivamente). Los resultados obtenidos han sido leídos teniendo como muestra de referencia la muestra 4143 la cual ha sido testada para el test de comparación internacional (I.S.A.G.).

Para la identificación de los fragmentos de las muestras amplificadas por PCR fueron analizadas en un secuenciador y posteriormente los datos recolectados durante la corrida por el programa GENESCAN® y analizados por el programa Genotyper® cuya interpretación se grafica como electrofenogramas (Fig. VIII, IX y X). Con el multiplex del INIA se observaron los 9 microsatélites amplificados para cada animal a partir de las muestras de DNA, los resultados en pares de bases se exponen en el cuadro III.

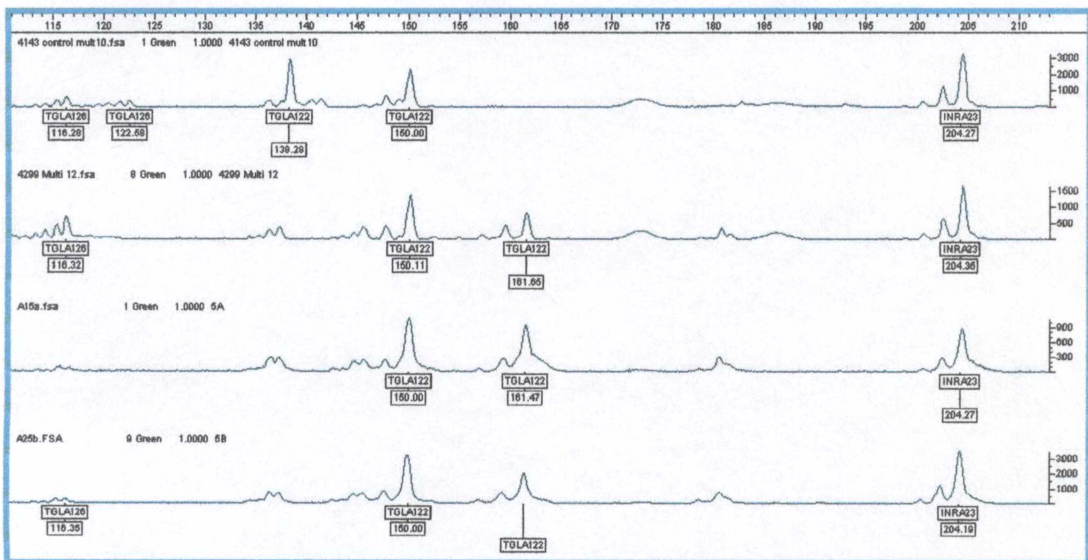


Figura VIII: Electrofenograma de los microsatélites TGLA126, TGLA122 e INRA023, para las siguientes muestras de arriba abajo: 4143 que es un control testado por la I.S.A.G., muestra 4299 de pelo y de sus respectivas carcazas 5 A, 5 B correspondientes los alelos (picos) al mismo animal.

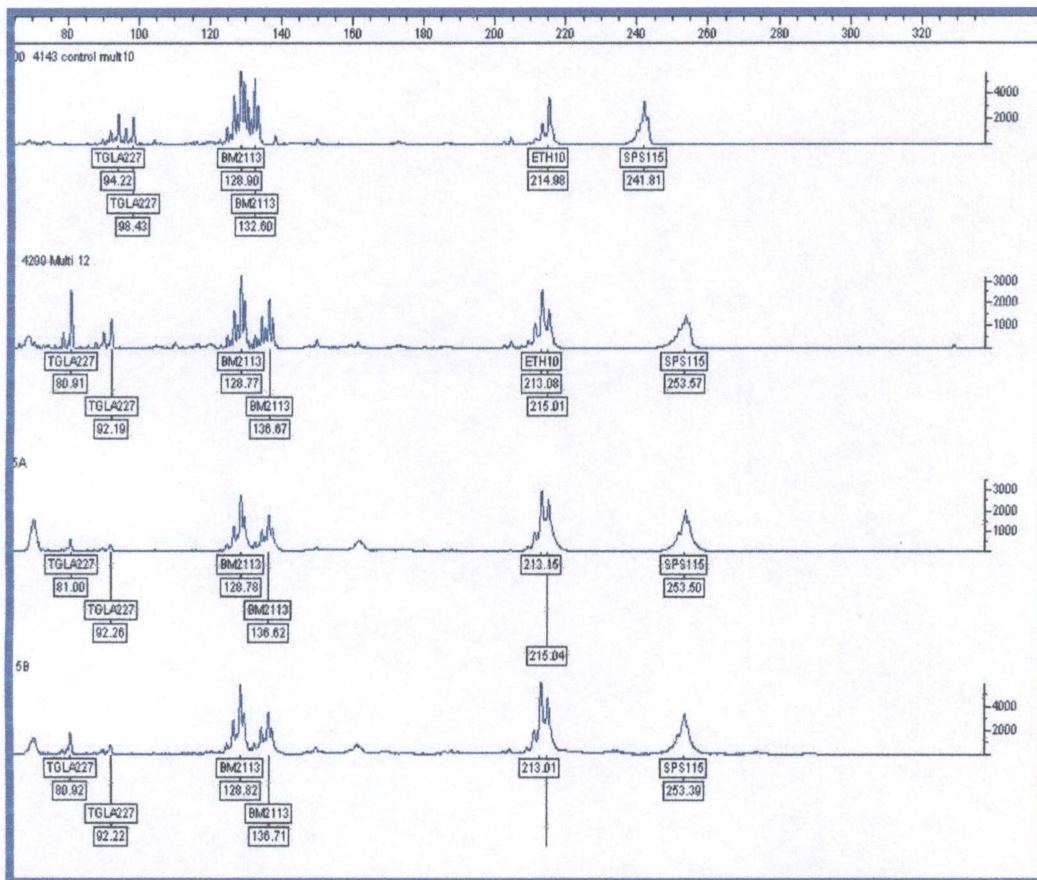


Figura IX: Electrofenogramas azules con los alelos (pares de base) de los MS: TGLA 227, BM 2113, ETH 10 y SPS 115, pertenecientes a la muestra 4143, 4249 y sus respectivas carcasas 5a y 5b.

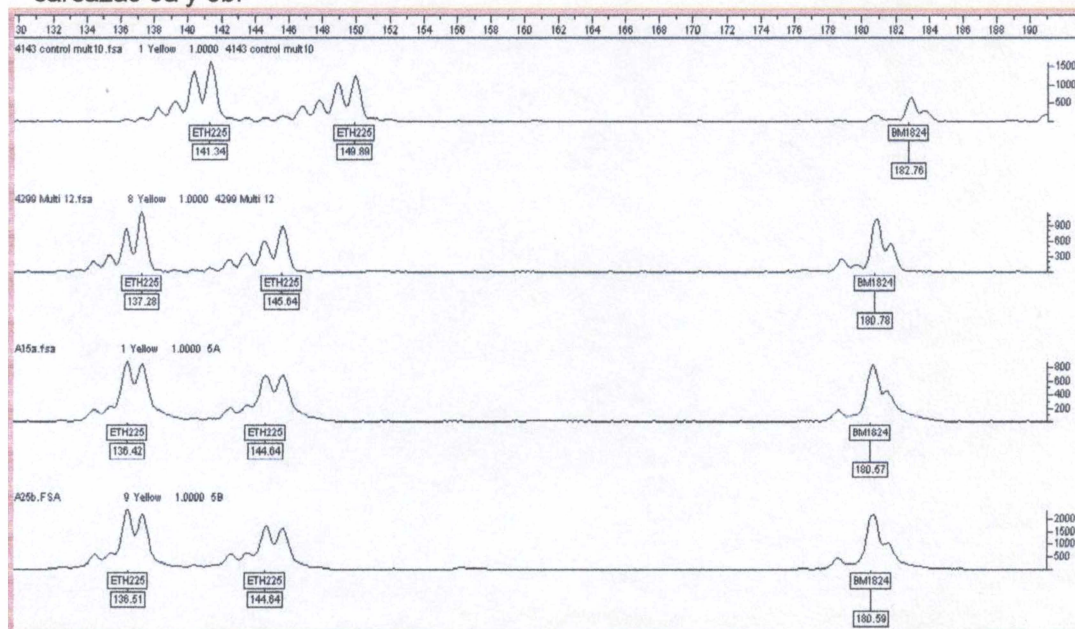


Figura X: Electrofenogramas de los microsatélites amarillos, con los alelos (pares de base) de los MS: ETH 225 y BM 1824, pertenecientes a la muestra 4143, 4299 y sus respectivas carcasas 5A y 5B.

En el cuadro III se resumen todas las muestras testadas para los MS y su interpretación en peso molecular.

Cuadro III: Se muestran los 11 genotipos de DNA para 9 microsatélites en pares de base, pertenecientes a las diferentes muestras: pelo y media carcasa (A y B) y su correspondencia con un mismo chip y N° ordinal.

CHIP	N. lab.	Fecha Faena	N° ordinal	Muestra	TGLA 227	BM 2113	ETH 10	SPS 115	TGLA 128	TGLA 122	INRA 23	ETH 225	BM 1824
4143		CONTROL			93/97	133/137	219	248	115/121	141/151	206	144/152	180/190
4179	6	13/10/05	28631149	pelo	81	141	217/221	248/260	117/121	143	214	146/150	178/180
				musc,A	81	141	217/221	248/260	117/121	143	214	146/150	178/180
				musc,B	81	141	217/221	248/260	117/121	143	214	146/150	178/180
4185	166	23/9/05	26572104	pelo	91/93	133/139	221	252	117	169	206/214	148	182
				musc,A	91/93	133/139	221	252	117	169	206/214	148	182
				musc,B	91/93	133/139	221	252	117	169	206/214	148	182
4189	16	13/10/05	28631150	pelo	81/91	137/139	217	256/260	121	141/183	214	140/146	178
				musc,A	81/91	137/139	217	256/260	121	141/183	214	140/146	178
				musc,B	81/91	137/139	217	256/260	121	141/183	214	140/146	178
4280	170	23/9/05	26572106	pelo	81/91	133/135	217/221	252/260	115	143/147	208/214	140/150	178/182
				musc,A	81/91	133/135	217/221	252/260	115	143/147	208/214	140/150	178/182
				musc,B	81/91	133/135	217/221	252/260	115	143/147	208/214	140/150	178/182
4281	9	13/10/05	28631145	pelo	89	135/141	219/221	248	117/123	141/143	208/214	144/148	182/188
				musc,A	89	135/141	219/221	248	117/123	141/143	208/214	144/148	182/188
				musc,B	89	135/141	219/221	248	117/123	141/143	208/214	144/148	182/188
4283	167	13/10/05	28631147	pelo	81/87	133	217/221	248/256	115/117	141/169	214	140/150	182/190
				musc,A	81/87	133	217/221	248/256	115/117	141/169	214	140/150	182/190
				musc,B	81/87	133	217/221	248/256	115/117	141/169	214	140/150	182/190
4287	168	23/9/05	26572110	pelo	81/89	133/137	221	248/254	115/117	143/169	214	140	182
				musc,A	81/89	133/137	221	248/254	115/117	143/169	214	140	182
				musc,B	81/89	133/137	221	248/254	115/117	143/169	214	140	182
4288	169	23/9/05	26572112	pelo	93	137/139	219/221	248/260	117	143	206/208	146/148	178/182
				musc,A	93	137/139	219/221	248/260	117	143	206/208	146/148	178/182
				musc,B	93	137/139	219/221	248/260	117	143	206/208	146/148	178/182
4289	17	13/10/05	28631144	pelo	89	125/139	217/221	260	115/117	141/143	202/214	140/148	178/182
				musc,A	89	125/139	217/221	260	115/117	141/143	202/214	140/148	178/182
				musc,B	89	125/139	217/221	260	115/117	141/143	202/214	140/148	178/182
4291	12	23/9/05	26572108	pelo	81/91	133	217/221	248	115/121	161/169	214	140/150	182/188
				musc,A	81/91	133	217/221	248	115/121	161/169	214	140/150	182/188
				musc,B	81/91	133	217/221	248	115/121	161/169	214	140/150	182/188
4299	5	23/9/05	26572106	pelo	81/91	133/141	217/219	260	115	151/161	206	140/148	178
				musc,A	81/91	133/141	217/219	260	115	151/161	206	140/148	178
				musc,B	81/91	133/141	217/219	260	115	151/161	206	140/148	178

-N°. Laboratorio: número de laboratorio.

-N° ordinal: número ordinal de faena.

-Musc, A: muestra de tejido muscular de una media carcasa.

-Musc, B muestra de tejido muscular de la otra media carcasa.

Frecuencia génica

El estudio estadístico para determinar el grado de polimorfismo existente en cada MS y en la totalidad de los 9 para éste ensayo se calculó según la cantidad de alelos que presentaban, su frecuencia génica y el índice de heterocigocidad (IH).

Siendo la frecuencia génica igual al número de alelos diferentes para dicho MS sobre el total de alelos de la muestra siendo 22 alelos para cada MS.

Cuadro IV: alelos, numero de alelos, frecuencias génicas e índice de heterocigocidad para los diferentes MS.

TGLA227				BM2113			
Alelos	n° alelos	Fr génica	I HET	Alelos	n° alelos	Fr génica	I HET
81	8	0,3636	0,1322	125	1	0,0455	0,0021
85	1	0,0455	0,0021	133	8	0,3636	0,1322
89	5	0,2273	0,0517	135	2	0,0909	0,0083
91	5	0,2273	0,0517	137	3	0,1364	0,0186
93	3	0,1364	0,0186	139	4	0,1818	0,0331
5 alelos	22	1,0000	0,2562	141	4	0,1818	0,0331
			0,7438	6 alelos	22	0,8182	0,2273
							0,7727
ETH 10				SPS 115			
Alelos	n° alelos	Fr génica	I HET	Alelos	n° alelos	Fr génica	I HET
217	8	0,3636	0,1322	248	8	0,3636	0,1322
219	3	0,1364	0,0186	252	3	0,1364	0,0186
221	11	0,5000	0,2500	254	1	0,0455	0,0021
3 alelos	22	1,0000	0,4008	256	2	0,0909	0,0083
			0,5992	260	8	0,3636	0,1322
				5 alelos	22	1,0000	0,29339
							0,7066
TGLA 126				TGLA 122			
Alelos	n° alelos	Fr génica	I HET	Alelos	n° alelos	Fr génica	I HET
115	8	0,3636	0,1322	141	4	0,1818	0,0331
117	9	0,4091	0,1674	143	8	0,3636	0,1322
121	4	0,1818	0,0331	147	1	0,0455	0,0021
123	1	0,0455	0,0021	151	1	0,0455	0,0021
4 alelos	22	1,0000	0,3347	161	2	0,0909	0,0083
			0,6653	169	5	0,2273	0,0517
				183	1	0,0455	0,0021
				7 alelos	22	1,0000	0,2314
							0,7686

-n° alelos: numero de alelos

-Fr génica: frecuencia génica

-IHET: frecuencia génica al cuadrado.

Cuadro V: alelos, numero de alelos, frecuencias génicas e índice de heterocigocidad para los diferentes MS (continuación)

INRA 23				ETH 225			
Alelos	n° alelos	Fr génica	IHET	Alelos	n° alelos	Fr génica	IHET
202	1	0,0455	0,0021	140	8	0,3636	0,1322
206	4	0,1818	0,0331	144	1	0,0455	0,0021
208	3	0,1364	0,0186	146	3	0,1364	0,0186
214	14	0,6364	0,4050	148	6	0,2727	0,0744
4 alelos	22	1,0000	0,4587	150	4	0,1818	0,0331
			0,5413	5 alelos	22	1,0000	0,2603
							0,7397

BM 1824			
Alelos	n° alelos	Fr génica	IHET
178	8	0,3636	0,1322
180	1	0,0455	0,0021
182	10	0,4545	0,2066
188	2	0,0909	0,0083
190	1	0,0455	0,0021
5 alelos	22	1,0000	0,3512
			0,6488

- n° alelos: numero de alelos
- Fr génica: frecuencia génica
- IHET: frecuencia génica al cuadrado.

El índice de heterocigocidad individual (presentado en color rojo) se corresponde con $1 - \sum (p_i^2)$. Siendo p_i la frecuencia génica se representa en los cuadros IV y V.

Índice de heterocigocidad global es el promedio del índice de heterocigocidad individual de todos los MS. Es un indicador de índice de polimorfismo existente.

INDICE DE He global
0,6873

7 DISCUSION

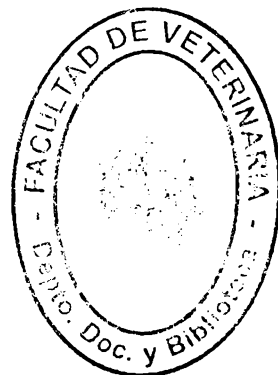
En los resultados obtenidos representados en el cuadro III, permite observar que la identidad para cada animal es única, con la utilización de 9 microsátélites por animal teniendo en cuenta que los genotipos de estos microsátélites no fueron compartidos por ningún individuo. Lo que indica en este caso un 100% de identidad de los 11 animales del estudio con la aplicación del KIT INIA para tipificación de DNA bovino.

Por otro lado se verificó una total coincidencia de los genotipos entre las tres muestras analizadas para cada animal, la de origen (pelo) y las de tejidos musculares (A y B) por lo tanto se asume que pertenecen a un mismo animal, no habiendo pérdida de la identidad en las etapas analizadas. Estas corresponden desde el, engorde, transporte y faena, corroborándose en ambos resultados; el de la identificación electrónica aplicada a estos animales con la de DNA. Teniendo en cuenta el precio de la caravana en el mercado actual (2US\$) y la de los tres análisis de DNA (75US\$), a pesar de ser ésta última una técnica costosa, estos resultados demuestran que presentan una alta exactitud para demostrar la identidad de cada animal, partiendo de diferentes tipos de muestras que contengan DNA (pelo, músculo, etc.). Lo que permite detectar cualquier tipo de cambio en la individualización durante el transporte hasta la faena. Este dato se confirma con el IH global bastante elevado de 70% (0,6873) que presenta esta muestra utilizando el Kit de DNA con 9 MS muy polimórficos (rango de 0,773 para BM2113 y el mas bajo de 0,541 para INRA23). Por lo cual se puede considerar una herramienta de identificación confiable, inalterable y capaz de rastrear la procedencia de la carne, mediante identidad en cualquier etapa de la cadena cárnica. A pesar de que no fueron evaluadas las otras etapas como: el procesamiento de los cortes dentro del frigorífico y posterior traslado a los diferentes centros de venta y/o exportación, que son las que presentan más riesgos. En este caso su aplicación serviría para detectar posibles errores en esos puntos de riesgo y permitiría auditar cualquier caso particular donde se requiera verificar el sistema de trazabilidad. Este costo podría verse disminuido aplicándose la tipificación de DNA sobre un porcentaje reducido de los animales, incluidos en el sistema de trazabilidad. Por otro lado al disponer de una herramienta de control y verificación para los otros métodos de trazabilidad que se usan en la producción ganadera, contribuirían a la certificación de origen de nuestra carne. Como consecuencia se podría percibir mayor valor de nuestra carne, considerando la importancia en nuestro país de la exportación de carne (73% del total faenado, Jiménez de Aréchaga y col, 2007) y que actualmente los mercados importadores aumentan en cantidad, así como en la demanda de carne de gran calidad, especialmente por aquellos países con mayores exigencias y poder adquisitivo.

Esta tecnología ya se está aplicando en algunos países de mundo como ejemplo Japón que lo utiliza como método para el consumo interno (Chávez y col. 2005).

Si se considera que existe una demanda creciente en el mercado mundial por carnes naturales y con garantías de origen e inocuas, se puede esperar que Uruguay adoptando estos sistemas de trazabilidad (electrónica y auditoría con DNA) permitía asegurar dichas condiciones y se mejoraría su posicionamiento en mercado exportador de carnes.

Otra ventaja que presenta esta técnica dada su especificidad es que permitiría detectar la especie animal a la cual pertenece la carne a analizar; pudiendo ser una herramienta de utilidad en casos de fraude en la comercialización de la carne, ofreciéndose como mecanismo de control.



8 CONCLUSIÓN

Se concluye que:

- La tipificación de DNA bovino sería una tecnología adecuada para avalar la identificación que se realiza por medio electrónico dentro del programa de trazabilidad, existiendo en este caso una total coincidencia entre ambos sistemas de identificación.

- Esta técnica debido a su alta eficiencia podría verificar el buen funcionamiento de la identificación electrónica analizando solo a un porcentaje del total de individuos, desde el inicio de la cadena (pelo al momento de colocar el chip) hasta el producto final (carne de consumo), como forma de asegurar el cumplimiento de las reglamentaciones referente a la trazabilidad electrónica, podría ser utilizada para su fiscalización, debido a su alta especificidad a consecuencia del gran polimorfismo existente dentro de cada microsatélite.

- Los sistemas de identificación mediante DNA tiene como ventaja de que no es necesario fijar una marca al animal solo requiere la extracción de muestra con DNA la cual debe ser almacenada durante la vida del animal y los productos derivados del mismo. Por otro lado se mantiene constante durante la vida animal hasta los productos (carne) no pudiendo ser removidos ni alterados y logrando ser analizado sin una previa identificación sobre el producto en cualquier etapa de la cadena.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. (2001). Manual de Usuario. Foster city, USA. Disponible en www.appliedbiosystems.com (20/8/2006).
- 2- Adib P., (2005) Trazabilidad en la cadena cárnica y en el comercio internacional. En Trazabilidad y diferenciación de calidad de procesos y productos agroalimentarios en el MERCOSUR: Cadena Cárnica Bovina. 1. 18 p.
- 3- Aranguren J., Román R., Isea W., Villasmil Y., Jordana J., (2005) Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de DNA por excelencia para programas de conservación: una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal; 13: 30-42.
- 4- Arias F. (2005). La trazabilidad del ganado. Curso: "Trazabilidad y diferenciación de calidad de procesos y productos agroalimentarios en el MERCOSUR". Montevideo, Uruguay. ed Facultad Veterinaria. en CD ROM.
- 5- Bianco M. y Chiappe M. (2005). Estado actual de los sistemas de trazabilidad para los bovinos de carne. En Trazabilidad y diferenciación de calidad de procesos y productos agroalimentarios en el MERCOSUR: Cadena Cárnica Bovina. Montevideo. 1. 34-48.
- 6- Bishop M., Kappes S., Keele J., Stone R., Sunden S., Hawkins G., Solinas S., Fries R., Grosz M., Yoo J., Beattie C. (1994). A genetic linkage map for cattle. Genetic. 136: 619.
- 7- Bowling A. (1994). Population genetics of Basin feral horses. Animal Genetics 25 (1): 67-74.
- 8- Bowling A. (1996). Parentage testing of horses. Horse's genetics. Ed CAB INTERNATIONAL. Cambridge. 82-96:
- 9- Bowling A., Eggleston-Stott M., Byrns G., Clark R., Dileanis S., Wictum E., (1997). Validation of microsatélites markers for routine horse parentage testing. Animal Genetics 28: 247-252.
- 10- CURSO INTERNACIONAL DE ALTA ESPECIALIZACIÓN. CD: Trazabilidad y diferenciación de calidad de procesos y productos agroalimentarios en el MERCOSUR: Cadena Cárnica Bovina. Montevideo, 4-13 de julio 2005. Organiza: Asociación de Universidades Grupo Montevideo, AUGM. Embajada de Francia en Uruguay – PREMIER (Programme Regional pour les pays du Mercosur et le Chili). Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y

Agroindustrial del Cono Sur – PROCISUR- e Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura –IICA-, Uruguay.

11- Cámara de Representantes ROU. (2006) Ley Nº 17.997 de fecha 2 de agosto 2006 del Sistema de Identificación y Registro Animal. Cámara de representantes. Disponible en www.presidencia.gub.uy/decretos/2004041502.htm (21/10/2007).

12- Chávez R., Felmer R., Floody H., Catrileo A., Sagredo R., Iraira S., Folch C., (2005). Implementación de un sistema de trazabilidad molecular de la carne bovina: selección de la muestra biológica definitiva y evaluación práctica en una planta de procesamiento de carne. En: *XXX Reunión Anual de SOCHIPA*, Temuco, Chile. Libro de resúmenes, Pp 37-38.

13- Crescionini E., Iribarne G. (2006) Capacidad de lectura de tres métodos de identificación animal y presentación para gestión de la información productiva. Ed Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo. 86p.

14- D.I.E.A. www.mgap.gub.uy/diea/Anuario2007/pages/a-indice.html (21/10/2007).

15- Duran H. (2003). Informe: Los pasos hacia la identificación individual oficial en Uruguay. Revista: Revista del Plan Agropecuario 108, 24-26.

16- Faber C., Medrano J. (2003). Putative in silico mapping of DNA sequence to livestock genome maps using SSLP flanking sequences. *Animal Genetics*. 34: 11-18.

17- Felmer R., Chávez R., Catrileo A., Rojas C., (2006). Tecnologías actuales y emergentes para la identificación animal y su aplicación en la trazabilidad animal. *Arch. Med. Vet.* 38, 3, 197-206.

18- Fonseca D. (2005). El cencerro digital. En *América Económica*; 295: 34-35.

19- Garin D. (2002). Desarrollo de bolos ruminales para la identificación electrónica de corderos y efectos de su utilización. Barcelona. Departament de Ciència Animal i dels aliments Universitat Autònoma de Barcelona. 139 p.

20- Garrido S. (2006). Trazabilidad de carnes: sistemas, coyuntura y futuro. Disponible en http://produccionovina.com.ar/produccion_organica_y_trazabilidad/31-trazabilidad_comparada.htm (15/3/2007).

21- Ghirardi J., Caja G., Hernández-Jover M., Sánchez A. (2007) Trazabilidad de bovinos y su carne mediante un sistema basado en el uso de la identificación electrónica y los marcadores moleculares. <http://www.aida->

itea.org/jornada38/genetica/trazabilidad_y_genetica_de_poblaciones/tgp2_ghirardi.pdf (15/04/2008).

22- Green R, (2007). La exigencia de la trazabilidad en los diferentes países del mundo. Trazabilidad de carnes en el mercado mundial. En PROCISUR. Ed Urbana Impresos. Montevideo. pp 7-47.

23- I.N.A.C. www.inac.gub.uy/. (20/8/2006).

24- I.S.A.G. www.isag.org.uk. (20/8/2006).

25- Jiménez de Arechaga M., Ponce J., Ponce R. (2007). Informe: La carne que viaja. Revista El País agropecuario; 142: 12-14.

26- Kappes S.M., Keele, JW., Stone RT., Mcgraw RA., Sonstegard TS., Smith TPL., López-Corrales NL., Beattie CW. (1997). A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*; 7: 235.

27- Kelly L, Pedemonte A, Solares E, Cardozo O, Aguerre V, Capdeville F. (2006). Verificación mediante análisis de DNA de la trazabilidad electrónica de carne bovina desde su establecimiento a la faena. En Jornadas de buiatría. XXXIV, Paysandú, Uruguay. 34: 192-194.

28- Kelly L, Solares E, Cardozo O, Aguerre V, Capdeville F. (2005) Avances de la tipificación de DNA bovino en una población cruce de Hereford del Uruguay. En Jornadas de buiatría. XXXIII, Paysandú, Uruguay. 33: 216-218.

29- Kelly L., Postiglioni A., (2002). Avances de la tipificación de DNA bovino en una población cruce de Hereford del Uruguay. En Jornadas de buiatría XXXIII. 9-11 de junio 2005, Paysandú, Uruguay. 33: 40- 44.

30- Kelly L., Postiglioni A. (1997). Marcadores Genéticos en equinos: I- Actualización de metodologías. Facultad de Veterinaria (Montevideo). Julio/Septiembre 1997. Vol. 33. (Nº 135): 10 - 12.

31- Magallanes J.2008. Trazabilidad: prioridad nacional
<http://www.presidencia.gub.uy/web/noticias/2008/03/2008032701.htm>(20/8/2006).

32- Moxon R., Willis Ch. (1999). Microsatélites de ADN. *Cientific American*; 208: 68 - 74.

33- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saika R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol* 51, 263-273.

- 34- Peyrou J., (2007). Comportamiento del sector carne vacuna en 2007 y perspectivas para 2008. Disponible en www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario06/htm/index.htm (20/4/2008).
- 35- Peyrou J., Ilundain M. (2006). Comportamiento del sector carne vacuna en 2006 y perspectivas para 2007. Disponible en www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario06/htm/index.htm (15/3/2007).
- 36- Piperno P., Olivera R. (2005). Sistema nacional de información ganadera una nueva herramienta para la salud animal. En Jornadas de Buiatría. XXXIII, Paysandú, Uruguay. 33: 40-41.
- 37- Reglamento oficial de inspección veterinaria de productos de origen animal, parte I. (1983). Montevideo. M.A.P.; D.G.S.G.; División industria animal. 121p.
- 38- Rincón G. (2002) Marcadores genéticos moleculares aplicados en estudios de variabilidad poblacional. CD: Curso de Posgrado Veterinaria-PEDECIBA: "Aplicaciones de la genética molecular de la genética molecular en la producción, sanidad y reproducción animal". Facultad Veterinaria-UDELAR. 39-44p.
- 39- S.N.I.G. www.snig.Trazabilidad - Traz Individual. (20/8/2006).
- 40- Sierra R. (2005). Trazabilidad animal en el Uruguay: necesidad, posibilidades y opciones. Disponible en www.planagro.com.uy/informacion/trazabilidad/trazab_uy.htm (20/8/2006).
- 41- Sierra R. (2006) Trazabilidad. Veterinarios. 6: 3-16.
- 42- S.I.R.A. www.inac.gub.uy/S.I.R.A.%20propuesta.pdf. (21/10/2007).
- 43- Smith G. (2001) Trazabilidad. Disponible en www.planagro.com.uy/informacion/trazabilidad/traza_garysmith.htm (21/10/2007).
- 44- Solinas Toldo S., Fries R., Steffen P., Niebergs HL. (1993) Physically mapped, cosmid- derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. Mamm Genome. 4: 720.
- 45- Stalling R., Ford A., Nelson D., Torney D., Hildebrand C. y Moyzis R. (1991). Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in human genomes. Genomics 10.807-815.
- 46- Steffen P., Eggen A., Dietz AB., Womack RA., Stranzinger G., fries R.(1993) Insolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. Anim Genet. 24: 121.

- 47- Sunden SLF., Stone RT., Bishop MD., Kappes SM., Keele JW., Beattie CW. (1993). A highly polymorphic bovine microsatellite locus: BM 2113. *Animal genet.* 24: 69.
- 48- Thomas J. (2005). Herramientas recomendadas para el control de procesos cadena cárnica bovina. "Enfoque del campo a la mesa". Curso: "Trazabilidad y diferenciación de calidad de procesos y productos agroalimentarios en el MERCOSUR". Montevideo, Uruguay. ed Facultad Veterinaria. en CD ROM.
- 49- Tamarin R., (1996). Principios de genética. 4ª. ed Barcelona, ed. Reverté, 607p.
- 50- Vaiman D., Mercier D. (1994). A set of 99 cattle microsatélites: characterisation, syneeny mapping, and polymorphism. *Mamm. Genom.* 5:288-297.
- 51- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A., (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel.*; 34: 275-305.