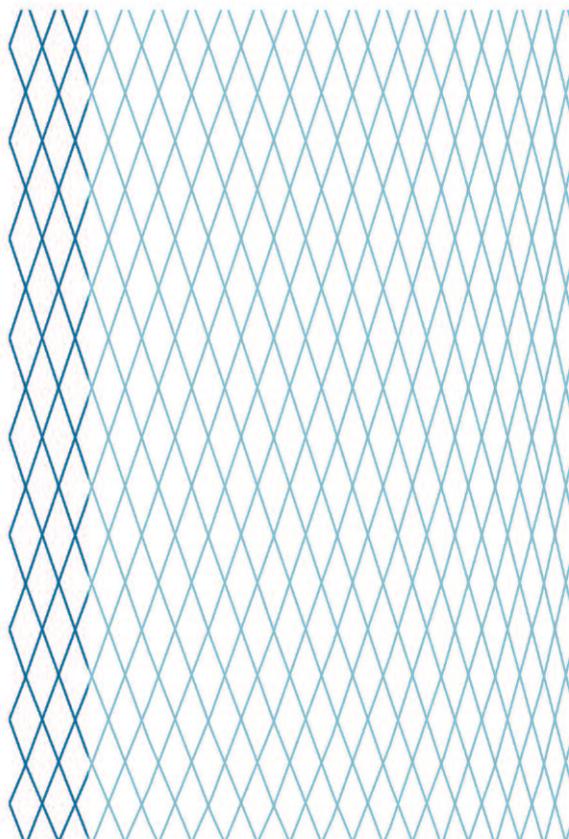


SELECCIONES DE **GENÉTICA** VETERINARIA I

A
G T
C



Silvia Llambí Dellacasa
M. Victoria Arruga Laviña

SELECCIONES
DE GENÉTICA
VETERINARIA
I



Silvia Llambí Dellacasa
y M. Victoria Arruga Laviña



Autoras: Silvia Llambí Dellacasa y M. Victoria Arruga Laviña

Diseño de portada e ilustraciones: Cristina Pablo Gimeno

Asesoramiento informático: Ing. Ana Moncada Pérez

ISBN: 978-84-697-9330-5

Depósito legal: Z 114-2018

- 07 **Prólogo**
- 11 **Capítulo I:**
El puzzle de los genomas de animales domésticos
- 31 **Capítulo II:**
La base de datos OMIA (Online Mendelian Inheritance in animals)
- 37 **Capítulo III:**
Intersexualidad en animales domésticos
- 59 **Capítulo IV:**
Enfoque genético al “*Déjà vu*” de las malformaciones congénitas en animales domésticos
- 75 **Capítulo V:**
Una mirada a la genética de la domesticación animal
- 85 **Capítulo VI:**
Epigenética. Transcriptomas y regulación epigenética en los animales domésticos
- 117 **Capítulo VII:**
Herramientas biotecnológicas que contribuyen a la mejora genética de los animales domésticos.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la
Universidad de la República-Uruguay (UdelaR).
A la Universidad de Zaragoza (UNIZAR).
A la Facultad de Veterinaria (UdelaR).

A familiares y amigos por el apoyo afectivo
para poder llevar a cabo esta obra.



PRÓLOGO

La biotecnología y la bioinformática están contribuyendo de una forma espectacular al desarrollo de las Ciencias Veterinarias y dentro de ellas, a la Genética Veterinaria. De tal forma estas disciplinas están avanzando conjuntamente que se puede decir que la actual práctica veterinaria requiere de colaboraciones muy estrechas con otros profesionales. Esta labor interprofesional enriquece, no solo el diagnóstico de las enfermedades y sus tratamientos, sino también el conocimiento de componentes bioquímicos, genéticos, epigenéticos, inmunológicos, fisiológicos, reproductivos, comportamentales, bienestar, etc., en el campo de las especies animales de interés veterinario.

La Genética Veterinaria es una de las disciplinas que más se está beneficiando de estos avances y colaboraciones por lo que, de forma continua, se publican nuevas técnicas, nuevos métodos, nuevos logros que se aplican al estudio de un saber más profundo acerca del genoma, del exoma y del proteoma de los animales de producción, de compañía y de las especies silvestres.

Este libro tiene como objetivo volver un poco la vista atrás y mirar algunos aspectos genéticos y epigenéticos de nuestras especies animales con nuevos ojos; traer a la actualidad y describir algunos de los avances que ya se están aplicando y que están contribuyendo a la lucha contra las enfermedades, a un mejor manejo, a una mayor producción y a una optimización de la atención veterinaria en la clínica y en la explotación, en el campo y en la Naturaleza.

Con este trabajo se busca, no una exhaustiva revisión de todos los campos veterinarios, ni tan siquiera de todos los campos y aspectos genéticos que han avanzado a gran velocidad, lo que sí se desea es actualizar una serie de facetas que se

consideran primordiales tanto en la clínica, como en la producción y en el manejo de las especies de animales.

El capítulo I (El puzzle de los genomas de animales domésticos) aborda el tema actualizado sobre los genomas de las principales especies domésticas con las que va a tener que trabajar un veterinario. El capítulo presenta una perspectiva histórica con referencia al Proyecto Genoma Humano y aporta una serie de datos sobre las principales plataformas de secuenciación masiva. Se brindan los links actualizados de los principales recursos “*on line*” para el estudio de los genomas y los últimos avances en genómica automatizada con ejemplos en las distintas especies.

El capítulo II (La base de datos OMIA, Online Mendelian Inheritance in Animals) trata sobre la importancia de esta base de datos y del crecimiento exponencial de información de características genéticas en especies domésticas durante el último decenio. Esta base fue creada y organizada por el Prof. Emérito Frank Nicholas de la Universidad de Sydney, Australia. Se presenta un estudio cuantitativo de características fenotípicas descubiertas en la especie bovina aplicando las nuevas técnicas de secuenciación y el uso de los chips de SNP. Para las autoras es un humilde tributo al Prof. Nicholas por los importantes aportes que continúa brindando a la enseñanza de la Genética Veterinaria.

El capítulo III (Intersexualidad en animales domésticos) aborda la determinación del sexo, profundizando en la importancia en la cría y en la producción veterinarias. Las alteraciones producidas y sus consecuencias son enormemente vinculantes al éxito reproductivo. Debido al papel crucial de los cromosomas sexuales (especialmente el cromosoma Y) en la determinación del sexo, los trastornos del desarrollo sexual en los animales domésticos son cuestiones importantes de analizar por la especial incidencia que presentan, dando lugar a un descenso de la fertilidad y por consiguiente de la producción, rompiendo el equilibrio genético en los animales portadores. El término intersexo se utiliza como sinónimo de hermafrodita para describir animales cuyos órganos genitales tienen algunas características de hembra y algunas de macho, siendo por lo general animales infértiles. Los hallazgos recientes demuestran una historia de los cromosomas sexuales sorprendentemente dinámica, marcada por una serie de perturbaciones drásticas en el cromosoma Y y cambios compensatorios en el cromosoma X. El cromosoma Y, por otra parte, esconde posibilidades insospechadas ya que, a lo largo de los cientos de años de evolución, ha conservado una serie de genes importantes para la supervivencia del macho y para el proceso de fecundación.

El capítulo IV (Enfoque genético al “*Déjà vu*” de las malformaciones congénitas en animales domésticos) introduce una visión holística de como abordar el

tema de las malformaciones congénitas en animales domésticos. Se encontrará una breve revisión histórica referenciada con explicación de posibles mecanismos genéticos en algunos casos de malformaciones congénitas en bovinos. Al final del capítulo hay un listado de recursos “*on line*” de museos privados y públicos (Universidades) donde se podrá hacer un recorrido virtual para profundizar en el mundo de la teratología.

El capítulo V (Una mirada a la genética de la domesticación animal) lleva a un tema de creciente importancia en la cría animal como es el conocimiento de genes y mecanismos que intervienen en el proceso de domesticación de los animales. Se detallan los principales cambios fenotípicos que han sufrido las especies animales en el proceso de la domesticación y se describe la hipótesis actual relacionada con el papel de las células madre provenientes de la cresta neural en la etapa embrionaria.

El capítulo VI (Epigenética. Transcriptomas y regulación epigenética en los animales domésticos) aborda en profundidad uno de los temas más actuales como la epigenética. Aquí se retoman antecedentes descritos en el primer capítulo con mayor profundización para llegar al tema medular de la epigenética en veterinaria. Comienza con la secuenciación completa del primer genoma de un organismo vivo, (la bacteria *Haemophilus influenzae*) y continúa con la gran explosión de genomas que fueron secuenciados a continuación, de forma que cuando se completó la secuencia del genoma humano, en el año 2003, más de 150 genomas de diferentes especies de seres vivos se habían completado. El número de genomas secuenciados no ha hecho más que crecer de forma exponencial. Este hecho aclaró a los científicos que no solo es el genoma lo que controla los caracteres que un organismo presenta, es decir, no son solo los componentes genéticos, como las mutaciones, las alteraciones cromosómicas, la selección natural o las migraciones, las que dan lugar al proceso evolutivo y a una mejora de la producción, sino que tiene que haber otros componentes que modifiquen la expresión de los genes y que actúen como interruptores que los activan o inactivan. Así, ha surgido de forma especialmente vinculante la nueva disciplina, hermana de la Genética, denominada Epigenética, mediante la cual se explica el fenómeno del silenciamiento de genes o de las alteraciones de su expresión (muchas patologías, como tumores, leucemias, infertilidad, alteraciones en el comportamiento, problemas de producción por causa de dietas y manejos inadecuados, etc.) sin que la secuencia de bases nitrogenadas del ADN se vea modificada.

El Capítulo VII (Herramientas biotecnológicas que contribuyen a la mejora genética de los animales domésticos) conduce hacia el estudio de la mejora de los

animales domésticos y de las plantas que sirven de alimento a la humanidad. Ganaderos y agricultores han sabido que una buena alimentación, sanidad, higiene, y una buena base genética son los parámetros principales para obtener una óptima producción de carne o de leche, o una buena cosecha. Con el desarrollo de la Ciencia y de la Biotecnología se han incrementado las herramientas para mejorar los anteriores parámetros. La Mejora Genética para alcanzar una mayor producción, está basada en el principio central $P = G + E$, es decir, el fenotipo de un animal (P) es el producto final de la interacción entre su genotipo o aptitud genética intrínseca (G) y su entorno o ambiente determinado (E). El interés del investigador genético es llegar a conocer qué proporción del fenotipo corresponde a la base genética o componente genético y qué proporción corresponde al ambiente, es decir al componente que no es genético. De lo que se trata es de aplicar los nuevos avances para conseguir que se logre una mejora que es función de la variación genética, de la precisión en la identificación de los progenitores genéticamente superiores, del intervalo entre generaciones y de la intensidad de la selección. En la actualidad, se están aplicando la Biotecnología y la Bioinformática para mejorar el progreso genético y grandes avances se están logrando mediante las tecnologías reproductivas, mediante la selección genómica y la selección asistida por marcadores (MAS), la producción de animales transgénicos y, de una forma más nueva y reciente, la aplicación de la metodología denominada CRISPR.



Capítulo I

EL PUZZLE DE LOS GENOMAS DE ANIMALES DOMÉSTICOS

Cuando se habla de genómica se refiere al análisis o estudio de los genomas y en este caso concreto, a los genomas de animales domésticos. En el estudio de los mismos se trata de conocer y analizar su contenido, lograr entender cómo se organiza y cuál es la función de sus componentes. Otro punto importante al estudiar los genomas es conocer cómo ha evolucionado la información genética y las relaciones filogenéticas entre los distintos seres vivos.

Antes de entrar en el tema de una genómica automatizada se va a comenzar a definir la “materia prima” con la que se trabaja. Dentro de las muchas definiciones que se pueden encontrar, una de ellas sería el material genético que permite formar y caracterizar un organismo vivo (eucariota, procariota) o un agente infeccioso viral.

Como modelo se tiene al genoma humano (*Homo sapiens*) que es la secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico) repartida en 23 pares de cromosomas ($2n=46$, XX las mujeres y $2n=46$, XY los hombres). El genoma haploide del humano está formado por 3200 millones de pares de bases con un número estimado de 20.338 genes codificantes (Gráfico 1).

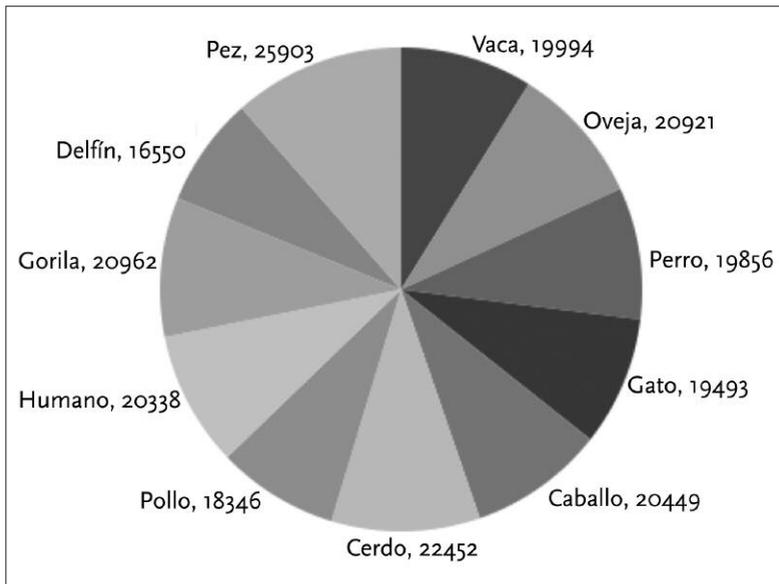


Gráfico 1: Número de genes codificantes en distintas especies (datos extraídos de <http://www.ensembl.org> Nov.2017).

También recordar que existe un genoma mitocondrial identificado por Nass y Nass (1963). En humanos el genoma mitocondrial tiene un tamaño de 16.569 pares de bases y codifica para 37 genes representando el 0.3 a 0.5% del genoma total. Este genoma es de herencia materna y se conocen varios tipos de mutaciones que se encuentran asociadas a distintas patologías o enfermedades mitocondriales. En humanos se encuentra la neuropatía ocular hereditaria de Leber (NOHL), la encefalopatía mitocondrial (síndrome de MELAS), la epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas (síndrome de MERRF) entre otras.

En caninos se han identificado mutaciones en la región *D-loop* del ADN mitocondrial, en tumores epiteliales localizados en distintas regiones corporales. Otra mitocondriopatía es la neuropatía atáxica sensorial de la raza Golden Retrievers. Los síntomas neurológicos comienzan entre los dos y ocho meses de edad. Desde el punto de vista clínico los cachorros presentan dificultad para mantener el equilibrio, incoordinación muscular con problemas en la marcha principalmente de los miembros posteriores. La enfermedad se observa en machos y hembras debido a que los dos sexos heredan la mutación a partir del genoma mitocondrial materno (mutación en el gen *tRNA-Tyr*). La aparición de la enfermedad dependerá del número de geno-

mas mitocondriales mutados que reciba el animal, por eso no siempre se observará sintomatología clínica en animales portadores. Hay machos de esta raza que presentan la mutación en baja proporción de sus mitocondrias y al cruzarse con hembras normales no van a transmitir la enfermedad.

Las definiciones de los “elementos” más primordiales de la herencia han ido cambiando según el avance de la ciencia. En 1865 Gregor Mendel hablaba de “carácter” a estas unidades de herencia. El término “gen” (del tronco griego “pangén”, pan “todo”, genos “origen”) introducido por Wilhem Johannsen (1909) estuvo basado en la teoría de la herencia de Gregor Mendel (1865). Este término difiere mucho con los avances logrados por la genómica. Hoy en día, para explicar la unidad primaria o “gen” no basta con la idea acuñada a mitad del siglo XX que definía a esta unidad como una secuencia nucleotídica de ADN que se transcribe a una molécula de ARN para generar, mediante el proceso de traducción, una proteína funcional. El “gen” pasó de ser una unidad elemental de la herencia a una unidad transcripcional. Los avances en la genómica han permitido tener otra visión del “gen” como una unidad no tan estática, ni precisa, ni tan uniforme. El concepto de “gen” dentro de la biología se encuentra debilitado o borroso; más aún podríamos decir que se habla de un concepto “abstracto” aunque no obsoleto. Por otro lado, cada día se encuentran secuencias que no se amoldan a una clasificación o nomenclatura estática. Si se piensa a nivel social, a los genes se les ha dado incluso un papel protagonista como si fueran entes con objetivos y decisiones propias como sostiene la teoría del biólogo, etólogo y evolucionista Richard Dawkins. Aunque todo ello es muy discutido. Este científico hace un reinterpretación de la selección darwiniana y habla del “egoísmo y el altruismo de los genes” en la cual los seres vivos serían tan solo a modo de vehículo mientras que los genes serían los protagonistas a la hora de propagarse ocupando el rol de motores evolutivos. En el capítulo VI se profundizará sobre la estructura química de los genes.

Otros elementos interesantes que aparecen en los genomas son los denominados seudogenes o pseudogenes que son secuencias de ADN muy parecidas al gen que se encuentra normalmente en una especie, pero no son funcionales. Esto es debido a que carecen de la región de regulación de la transcripción o presentan acumulación de mutaciones nocivas. Se generan mediante mecanismos de retrotransposición de ARN mensajero o por duplicaciones genómicas. Otra particularidad es que carecen de intrones y tienen sitios de unión a microARN participando en complejas redes de regulación postranscripcional. En la actualidad se está revisando el papel que cumplen pues se ha demostrado que muchos seudogenes presentan actividad transcripcional dando lugar a ARN no codificantes (ncARN). Éstos tendrían

un papel de importancia en determinadas enfermedades y procesos biológicos. En humanos hay un número similar de pseudogenes (aproximadamente 15.000) siendo compatibles con el número de genes codificantes para proteínas. El número descubierto de este tipo de secuencias es variable dentro de las especies (Gráfico 2).

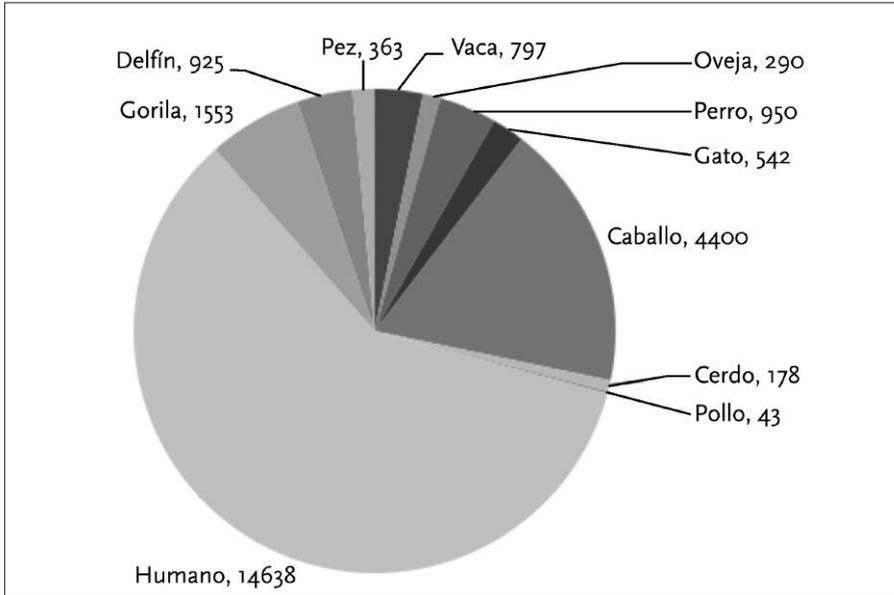


Gráfico 2: Número de pseudogenes en distintas especies (datos extraídos de <http://www.ensembl.org> Nov.2017).

Regresando a la genómica, ésta se puede abordar con distintos enfoques y grados de profundidad, por ejemplo, la llamada genómica estructural y como la palabra lo dice se encargará de estudiar la estructura del genoma en forma completa. A medida que se fueron secuenciando genomas de especies relacionadas surge la necesidad de compararlos y a este tipo de estudio se le denomina genómica comparativa. Los estudios de genómica comparativa son valiosos en veterinaria debido a que al encontrarse frente a una enfermedad hereditaria estudiada en una especie se puede extrapolar información a otra especie donde hay una sintomatología similar. En conclusión, la genómica comparada estudia la función, el contenido y la organización de genomas de diferentes especies u organismos y los compara con otros previamente secuenciados y a su vez con genomas ancestrales. Una vez que se conoce la

estructura de un genoma surge la necesidad de seguir avanzando en el conocimiento de la función del mismo y ahí surge la Genómica funcional que engloba las llamadas “ómicas” (del: griego-oma $\omega\mu\alpha$, indica conjunto o masa). Aquí se estudiarán los productos de expresión de los genes en un momento determinado o bajo distintas condiciones (transcriptómica, proteómica, metabolómica entre otras). No se puede dejar de nombrar a la metagenómica que se encarga del estudio de comunidades microbianas en un determinado ambiente sin necesidad de aislarlos (genómica ambiental). En la genómica funcional se requiere manejar programas bioinformáticos para procesar grandes volúmenes de datos provenientes de las nuevas técnicas de secuenciación de alto rendimiento.

Han pasado 40 años de la secuenciación completa del primer genoma (bacteriófago) y ha sido un largo recorrido para llegar a genomas de especies domésticas (Figura 1). Los avances en las nuevas técnicas de secuenciación de genomas a día de hoy, son a través de plataformas automatizadas de secuenciación masiva. Actualmente se ofrecen servicios de la llamada Next-Next Generation Sequencing (NNGS). Esta plataforma utiliza la técnica de secuenciación en tiempo real de moléculas simples de ADN y tiene la capacidad de secuenciar 8 genomas humanos simultáneamente en un mismo análisis, abaratando costes y tiempo.

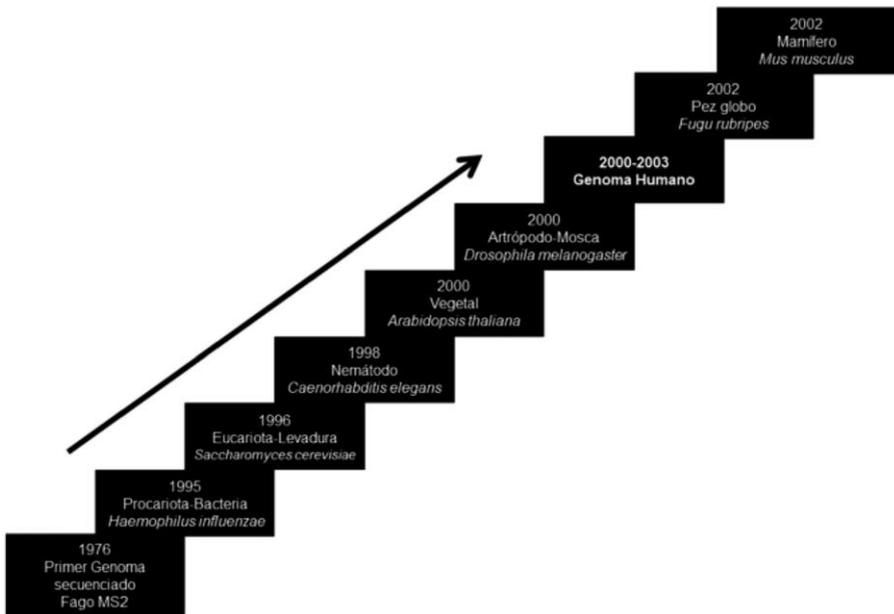


Figura 1: Cronología de la secuenciación de genomas desde los virus al ratón.

Históricamente se puede decir que se comenzó con una etapa de secuenciación manual con isótopos radiactivos y geles de poliacrilamida pasando a las etapas automatizadas con utilización de fluorocromos. Una de las técnicas de aporte fundamental para posibilitar estos saltos fue la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) diseñada por Mullis en el año 1983. La PCR permitió acelerar el desarrollo de la secuenciación debido a que ya no se tenía la limitante de cantidad de ADN y los fragmentos a analizar se podían amplificar miles de veces. La etapa de secuenciación automática comienza en 1987 por el método Sanger, pero con marcación fluorescente. La pionera fue la empresa Applied Biosystems con su modelo de secuenciador de ADN, ABI370A. En 1995 se logra la secuenciación del primer genoma bacteriano (*Haemophilus influenzae*) por el equipo de Venter (fundador del Institute for Genomic Research, TIRG), mediante la técnica de Whole Genome Shotgun (WGS) con secuenciadores ABI373. En la WGS el material genético es fraccionado al azar y luego clonado en vectores de secuenciación desconociendo la posición que ocupan en el genoma. Esta fue una de las técnicas utilizadas en el Proyecto Genoma Humano, donde el propio Venter anunciaba que para el 2001 se tendría la disponibilidad del 90% de la secuencia de este genoma. El proyecto genoma humano (PGH) comenzó en el año 1990 y fué planificado a 15 años. Desde su comienzo se vivió como una carrera de alta competición entre dos grandes grupos de biología molecular (HUGO y Celera). En febrero del 2001 se dan a conocer los primeros borradores con un tamaño de 3.2 Gb en dos publicaciones simultáneas en las más importantes revistas científicas de Estados Unidos (Nature y Science). En el año 2003 surge la necesidad de comenzar a darle un sentido biológico a las secuencias de ADN y se genera el proyecto público ENCODE (enciclopedia de elementos del ADN) a propuesta del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano de Estados Unidos (NHGRI, <https://www.genome.gov/>). Su principal objetivo se centró en el conocimiento de los elementos funcionales del genoma.

En la década de 1970 el investigador Comings discute la naturaleza del ADN “chatarra” (“junk DNA”) aplicándolo a todo ADN no codificante y no funcional. El término es acuñado por Ohno que plantea la hipótesis de que los genomas de mamíferos no podrían tener más de 30.000 loci bajo selección ya que ese sería el límite para poder soportar un costo de cargas mutacionales perjudiciales sin perder aptitud o llegar a una extinción de especie. En los años posteriores se fueron descubriendo que en este ADN “chatarra” existían secuencias con cierta estructura y particularidades propias (transposones, intrones, ADN espaciador, pseudogenes, ADN satélite, secuencias reguladoras, promotores). El proyecto ENCODE trata de darle sentido y descifrar su funcionalidad.

En 2012 se dan resultados de este proyecto identificándose 4 millones de regiones reguladoras dentro del genoma humano. Por lo que los resultados de ENCODE dan por tierra la hipótesis del “ADN chatarra” y solo una mínima parte del ADN no cumpliría una función. Estos resultados dan lugar a reflexionar sobre las desviaciones del modelo tradicional del siglo pasado debiéndose plantear un cambio de paradigma.

La fiebre de la secuenciación automática va de la mano del desarrollo de la bioinformática para realizar el análisis de datos y ensamblaje de las secuencias. El ensamblaje es un tema crucial ya que se refiere a ordenar y alinear el puzzle de fragmentos de ADN obtenidos por distintos métodos de secuenciación para reconstruir la secuencia original de un genoma en forma ordenada. Hay que tener en cuenta que este proceso debe ser riguroso y resolver problemas generados por la complejidad de las secuencias que se encuentran en determinados genomas, como por ejemplo el humano o el bovino. Esta complejidad puede deberse a la presencia de secuencias repetidas o a la diversidad de clones que se generan en el proceso de secuenciación entre otras causas. Es por eso que se habla de un proceso de tres instancias o pasos: la filtración de secuencias, la selección de las mismas y la unión o ensamblaje final. Actualmente se están resolviendo y reconsiderando varios errores que se han producido por ensamblajes defectuosos en los genomas de distintas especies. En todos estos procesos el análisis bioinformático es crucial. La bioinformática es considerada actualmente una disciplina de la ciencia en donde se integran conocimientos de biología, computación y tecnología de información. Dentro de la llamada biología “in silico” se conoce la utilización de recursos de programas informáticos y bases de información de secuencias para ensamblar y alinear las mismas pudiendo identificar virtualmente exones, intrones, regiones reguladoras (5’UTR, 3’UTR), regiones conservadas, etc.

A nivel mundial hay bases interconectados “*on line*” donde se depositan las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de diferentes especies existiendo una estrecha colaboración entre ellas: 1) National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 2) European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI, <https://www.ebi.ac.uk/>) y 3) DNA Data Bank of Japón (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>).

La secuenciación de genomas de especies domésticas si bien comienza antes del cambio de siglo (década de 1990), sus primeros borradores se dan a conocer en el siglo XXI, principalmente a través de Consorcios donde participan organismos estatales, organizaciones académicas y el sector industrial según la especie e interés económico de la misma (Tabla 1, Gráfico 3).

Especie	Año de publicación (primer borrador)	Chip SNPs de mayor densidad a la fecha (Compañía)
Pollo (<i>Gallus gallus</i>)	2004 (Int. Chicken Genoma Consortium., 2004)	Chicken 60K bead chip (Illumina)
Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)	2005 (Lindblad-Toh <i>et al.</i> , 2005)	CanFam2.0170.000 markers (SNPs, CNV) (Illumina)
Cerdo (<i>Sus scrofa</i>)	2007 (Humphray <i>et al.</i> , 2007)	PorcineSNP60 (Illumina)
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	2009 (Bovine GenomeSequencing and analysis & Consortium., 2009)	BovineHD BeadChip777.000 SNPs (Illumina)
Equino (<i>Equus caballus</i>)	2009 (Wade <i>et al.</i> , 2009)	EquineSNP50 (Illumina) Equine SNP70 (GeneSeek)
Gato (<i>Felis catus</i>)	2007 (Pontius <i>et al.</i> , 2007)	63 Cat DNA array (Illumina)
Ovino (<i>Ovis aries</i>)	2014 (Jiang <i>et al.</i> , 2014)	OvineSNP50 (Illumina)

Tabla 1: Cronología de los primeros borradores genómicos publicados en revistas científicas para los animales domésticos.

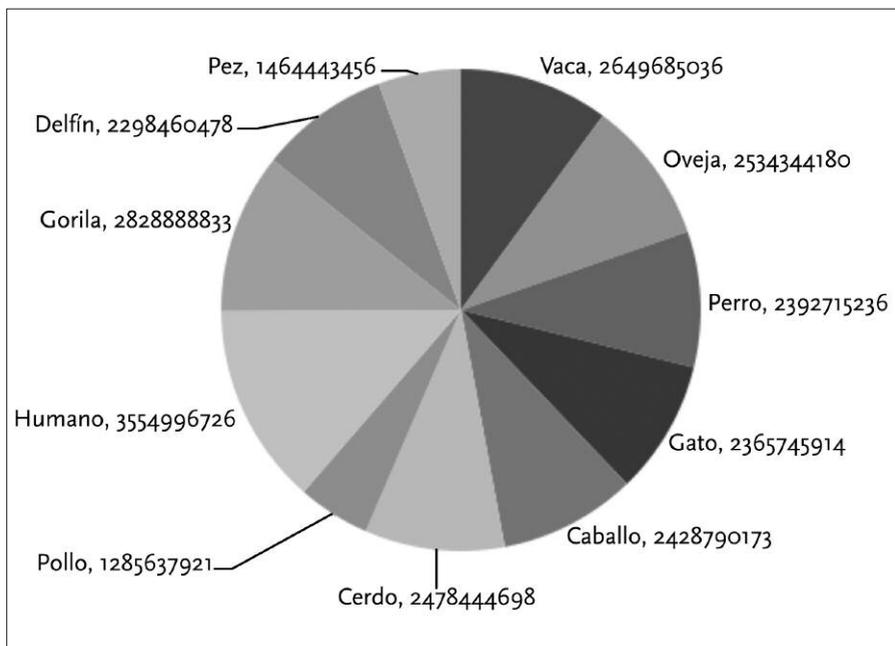


Gráfico 3: Tamaño de distintos genomas animales en pares de base (datos extraídos de <http://www.ensembl.org> Nov.2017).

El Genoma del pollo

El pollo (*Gallus gallus*) como primer ave cuyo genoma se secuenció de forma completa, ocupa un lugar estratégico desde el punto de vista evolutivo entre peces y mamíferos. En la secuenciación del mismo participaron 50 laboratorios y centros de investigación de todo el mundo reunidos en un Consorcio Internacional. La raza secuenciada fue una hembra “Red Jungle Fowl” de origen asiático, siendo el tronco original del que descienden las gallinas domésticas actuales con $2n=78$ cromosomas. El genoma está compuesto por macrocromosomas y microcromosomas mediante el sistema sexual ZW (las hembras son ZW y los machos ZZ). La importancia de conocer en profundidad el mismo no solo radica en el interés de la industria avícola sino por la relación de esta especie con virus oncogénicos (oncovirus del sarcoma de Rous).

Otra motivación fue que el pollo es un modelo para estudio de la embriología del desarrollo. La primera etapa de secuenciación fué mediante mapeo físico y a esta versión se la denominó galGal1. La misma fue mejorando a medida que la tecnología de secuenciación avanzaba y en el 2011 se lanzó la versión galGal4 donde se estima un tamaño de 1.285 millones de pares de bases. Según el último ensamblaje hay 18.346 genes codificantes. El genoma del pollo tiene un tamaño menor que la mitad del genoma de ratón o del ser humano (Gráfico 1).

Páginas Web sugeridas

http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Info/Annotation

<http://genome.cshlp.org/content/15/12/1692.full>

<http://www.chick.manchester.ac.uk/>

<http://www.genomenewsnetwork.org/articles/2004/03/04/chickens.php>

El Genoma del mejor amigo del hombre

La primera secuenciación completa del genoma canino (*Canis lupus familiaris*) se publicó en la revista Nature en el año 2005 (genoma de una hembra de 12 años de la raza bóxer llamada Tasha). Se estima que el perro tendría un genoma con un tamaño de 2.392.715.236 pares de bases y unos 19.000 a 20.000 genes (menor que el número estimado en humanos) repartidos en 39 pares de cromosomas. La separación evolutiva de los antepasados del perro y del humano comenzó hace unos 95 millones de años (Era de los dinosaurios). Más adelante, cuando el ser humano

comenzó a domesticar y criar al perro el vínculo entre ambas especies se hizo muy estrecho (15.000 años atrás). En la actualidad, el perro es uno de los mamíferos que presenta una mayor diversidad fenotípica (tamaño, forma del cráneo, remodelación cerebral) con más de 400 razas producto de la selección artificial. Como ejemplo clásico viene a la mente la diferencia de tamaño corporal entre un cánido de raza gran danés y un chihuahua. El avance en las investigaciones sobre el genoma canino ha sido motivado principalmente por ser una especie que tiene propensión a desarrollar patologías con base genética que pueden ser modelo de estudio en la especie humana (cardiopatías, cáncer, sordera, enfermedades autoinmunes, diabetes). Por otra parte, es un animal tan adaptado al núcleo familiar del ser humano que cada día se invierte más dinero en la salud de esta especie. Por ejemplo, se estima que el número de caninos registrados en Europa asciende a 75 millones mientras que en Estados Unidos la cifra es de 85 millones, siendo el país con mayor cantidad de perros. Entender su genoma puede dar luz a profundizar en el conocimiento de la genética del comportamiento, del desarrollo embrionario y de las bases evolutivas ya que hay una conservación inalterada de los genomas de 5% desde hace más de 100 millones de años (elementos funcionales comunes a las mayoría de los mamíferos). Por otra parte, las variaciones encontradas en este genoma, que pueden ir desde cambios de una base (SNPs) hasta duplicaciones de genes y regiones cromosómicas, vienen siendo investigadas en distintas razas. En la raza Whipped se vio que la pérdida de dos bases del tercer exón del gen de la miostatina (*MSTN*) genera la diferencia entre un perro de silueta delgada frente a un Whippet de silueta corpulenta o doble musculo (“bully” Whippet). Los individuos heterocigóticos (“fast” Whippet) para esta delección, son más musculosos y rápidos que los individuos homocigóticos normales. Mientras que los “bully” Whippet (homocigóticos con los dos alelos mutados) son animales con un desarrollo muscular extremo y menos rápido, presentando manifestaciones clínicas de calambres musculares cuando son obligados a realizar entrenamiento físico. Se piensa que las duplicaciones génicas pueden contribuir a generar nuevas innovaciones funcionales, como en el perro donde hay determinados genes específicos que presentan este fenómeno (genes relacionados con receptores olfativos).

En la raza de perros Rhodesian Ridgeback (crestado rodesiano) la característica de presentar una cresta simétrica y definida sobre la espina dorsal, con crecimiento en sentido contrario al resto del pelaje, es producto de una duplicación de una región del genoma. Esta duplicación es del tipo variación del número de copias en el genoma (copy number variation, CNV) presenta un tamaño de 133.000 pares de bases (133 kb) y se localiza en el cromosoma 18. Se comporta como un rasgo con

herencia de tipo dominante (basta un solo alelo llamado alelo Ridge con dicha duplicación, para que se manifieste la cresta). En esta duplicación hay involucrados tres genes de factor de crecimiento de fibroblastos, (*FGF3*, *FGF4*, *FGF19*) además de un proto-oncogén (*ORAOV1*) y una parte del gen *CCND1* que codifica para una proteína ciclina D1. Actualmente la utilización de herramientas moleculares como los paneles de microchips de ADN (ej. MyDogDNA® test) han permitido identificar variantes de riesgo de enfermedades genéticas en razas donde todavía no se han manifestado. Esto posibilita al médico veterinario brindar asesoramiento genético y realizar un preciso diagnóstico molecular.

Páginas Web sugeridas

http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Info/Annotation

<http://www.mydogdna.com/>

https://research.nhgri.nih.gov/dog_genome/about.shtml

<https://www.smithsonianmag.com/smart-news/dog-genome-project-reveals-secrets-canine-family-tree-180963053/>

<http://genome.cshlp.org/content/15/12/1706.full>

<http://www.research.ed.ac.uk/>

El Genoma Bovino

El proyecto genoma bovino comienza a gestarse en el año 2003 en forma de Consorcio Internacional, liderado por el Baylor College (Texas, Estados Unidos) contando con un presupuesto que superó los 50 millones de dólares. En este proyecto se involucraron más de 300 investigadores provenientes de 25 países. El objetivo primario era conocer la secuencia total y ensamblarla. En los bovinos se conocen más de 700 razas con una alta variabilidad genética distribuidas alrededor del planeta. A nivel cromosómico esta especie tiene una dotación de $2n=60$ (29 pares de autosomas acrocéntricos y un par de cromosomas sexuales XY). Entre las dos especies existentes de ganado bovino (*Bos taurus indicus* y *Bos taurus taurus*) existe a nivel cromosómico una diferencia en la morfología del cromosoma sexual Y. En el *B. taurus indicus* la morfología del Y es acrocéntrica, mientras que en *B.taurus taurus* es de morfología submetacéntrica. El primer borrador fue publicado en el año 2009 en la revista Science y se realizó con el ADN de una vaca de la raza Hereford llamada “L1 Dominette” (01449). Se estima un genoma con un tamaño de 2.649.685.036 de pares de bases y 19.994 genes codificantes.

El adelanto en el conocimiento del genoma permitió el desarrollo de la selección genómica utilizando chips de marcadores moleculares SNPs de alta densidad para características de interés económico en producción, reproducción y sanidad de esta especie. Esta especie no solo tiene una importancia económica sino que por su biología es un excelente modelo para la comprensión del funcionamiento de otros mamíferos ruminantes. Actualmente se viene dando una discusión científica no menor sobre los tipos de ensamblaje diferentes que se han utilizado para el genoma bovino. Existen dos grupos de secuencias del genoma bovino: Btau4.6 y UMD3.1 y ambas utilizan algoritmos de ensamblajes distintos. Estas bases de anotación han recibido aportes de mapas físicos y genéticos. El problema radica en que cuando se comienzan a comparar los ensamblajes de los dos genomas bovinos están apareciendo discordancias. Estas discordancias pueden generar problemas o errores a la hora de realizar estudios de selección genómica en el ganado. Zhou *et al.*, (2015) viendo este problema de ensamblaje proponen la creación de un nuevo recurso denominado mapa óptico BtOM1.0 (mapa físico de alta resolución con tamaños promedio de fragmentos de restricción de 8.91 Kb). Utilizando este mapa óptico pudieron observar que el genoma ensamblado Btau4.6 tenía casi el doble de discordancias frente al genoma UMD3.1. Estas discordancias entre secuencia y mapa se generaban principalmente por ensamblaje erróneo, secuencias translocadas e invertidas, deleciones de secuencias extrañas, inserciones en lugares de secuencias faltantes, agregados de sitios de restricción adicionales y/o eliminación de sitios de restricción. La utilización de este mapa óptico BtOM1.0 (construido con ADN de “L1 Dominette”) como “curador” de discordancias entre ambos genomas permitiría llegar a una versión de secuencia de referencia más precisa y unificada. Este recurso promete ser valioso a la hora de realizar estudios comparativos entre razas o poblaciones de ganado con mayor solidez y certeza.

Páginas Web sugeridas

https://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Annotation

<http://bovinegenome.org/>

<http://www.1000bullgenomes.com/>

<http://www.canadacow.ca/>

<https://www.animalgenome.org/cattle/>

<https://www.hgsc.bcm.edu/other-mammals/bovine-genome-project>

El Genoma Ovino

Los ovinos (*Ovis aries*) ocupan un escalón de importancia en la cría animal con fines productivos no solo por la producción de lana natural sino por la producción de carne para consumo, producción de leche y sus derivados. Mediante la tecnología de la plataforma Illumina el Consorcio Internacional del Genoma Ovino integrado por 26 instituciones de 8 países (International Sheep Genome Consortium, ISGC) presentan la secuenciación del genoma total de un macho y una hembra de la raza Texel como genoma de referencia ($2n=54$, XY los machos y $2n=54$, XX las hembras).

Ya existían previamente borradores parciales que sirvieron para ir completando las lagunas existentes (ensamblaje v1.0 mediante lecturas con la plataforma Roche 454). Es un genoma con un tamaño de 2.534 millones de pares de bases y 20.901 genes codificantes (Gráfico 1 y 3). Durante el proceso de secuenciación se sucedieron varias etapas intermedias: en el año 2009 se presentan las bases moleculares para el desarrollo del diseño de chips de SNP (Illumina SNP50 BeadChip) denominándose Oarv1.0, posteriormente en 2011 y 2012 se publican online las versiones borrador del genoma de referencia Oarv2.0 y Oarv3.1. El proyecto estuvo liderado por investigadores de CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation) agencia para el desarrollo de la investigación científica del Gobierno de Australia. La finalidad era lograr un conocimiento profundo del genoma y buscar nuevas estrategias para la mejora de esta especie. Australia es un continente donde abundan los ovinos (70 millones de cabezas) mientras que a nivel mundial se piensa que existen 1.000 millones por lo que esta especie tiene un importante papel en la agroeconomía.

Jiang *et al.*, 2014 publican parte del genoma ovino en la revista Science con un sugestivo título “El genoma de la oveja ilumina la biología del rumen y el metabolismo lipídico” con un perfil donde se incluía genómica funcional (transcriptómica de diferentes tejidos). Estos investigadores identificaron segmentos duplicados existiendo puntos de corte al hacer estudios comparativos con los bovinos. La construcción de un árbol filogenético permitió estimar la separación de cabras y ovejas así como la diversificación con los bóvidos (bovinos, Yac) siendo esta separación contemporánea a la expansión de los pastos en el neógeno tardío. Así mismo dieron a conocer genes que solo se expresan en rumen y no en piel (genes rumen específicos como el *TCHHL2*, Trichohyalin-like 2). Hay que recordar que la estructura de este pre-estómago que tiene unos 35 a 40 millones de años de evolución y

su microflora, es vital para la digestión de este herbívoro. El rúmen tiene una superficie rica en queratina muy similar a la piel.

Existe un complejo de genes que intervienen en el desarrollo epidérmico de los mamíferos y sus productos proteícos están relacionados con la queratinización de la epidermis a nivel de piel, lana y rúmen (región EDC con 70 genes). La región EDC de la oveja tiene varios genes no identificados o mal anotados en otros genomas de mamíferos. Por otro lado la importancia de estos animales productores de lana dirigió la investigación hacia dicha producción identificándose nuevas rutas y caminos del metabolismo lipídico en la piel de estos rumiantes. Estas rutas se relacionan con el desarrollo de lana y la producción eficiente de grasa en lana (lanolina formada por ésteres de cera).

La vía MOGAT (genes de la cascada metabólica de la acilglicerol O-aciltransferasa) en la piel de oveja puede facilitar la producción de lana. Hay dos genes (*MOGAT2* y *MOGAT3*) que presentan expansiones genéticas en tándem en los rumiantes y se expresan en piel de oveja pero no a nivel hepático, mientras que en humanos, *MOGAT3* es un gen importante que codifica enzimas hepáticas. Las expansiones de estos genes son indicativas de funcionalidad durante los procesos evolutivos de las especies. Estos descubrimientos sugieren que la pérdida de expresión de *MOGAT2* y *MOGAT3* en el hígado ovino reduce la importancia de este órgano en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga en comparación con los no rumiantes.

La presencia de expresión de *MOGAT2* y *MOGAT3* en la piel de oveja indica que puede haber una vía alternativa para la síntesis de diacilglicerol (DAG) (Jiang *et al.*, 2014).

El desarrollo del estudio del genoma ovino y bovino sigue planteando nuevos desafíos en genética fundamental para comprender fenómenos intrínsecos de metabolismo lipídico y digestión de rumiantes relacionados con el efecto invernadero y el cambio climático.

Páginas Web sugeridas

<http://www.sheephapmap.org/>

<https://www.csiro.au/>

<https://www.hgsc.bcm.edu/other-mammals/sheep-genome-project>

<http://www.livestockgenomics.csiro.au/sheep/oar3.1.php>

<http://sheepgenomesdb.org/>

El Genoma del gato

El genoma de un gato doméstico (*Felis catus*) ($2n=38$, XY, 18 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales) de nombre “canela” de raza Abisinia fue publicado en la revista *Genome Research* por investigadores del Cold Spring Harbor en el año 2007. El mapeo comparativo con especies como humano, rata, perro y bovino mostró la existencia de un importante número de reordenamientos cromosómicos producto de la divergencia de distintos linajes de mamíferos a partir de un ancestro común (100 millones de años atrás). La genómica comparativa permitió identificar 19.493 genes codificantes en un genoma que tiene un tamaño aproximado de 2.365 millones de pares de bases.

Censos poblacionales realizados en el 2015 y 2017 estiman la existencia de 66 millones de gatos en Europa y 77 millones en Estados Unidos. Los gatos domésticos están considerados, al igual que los perros, integrantes del núcleo familiar por lo que la secuenciación del genoma redundará en beneficios para la salud de los mismos.

El gato doméstico también es considerado como modelo de estudio de enfermedades del humano incluidas las de tipo infeccioso ya que el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) presenta similitudes desde el punto de vista genético con el virus de la inmunodeficiencia humana o SIDA (HIV).

Páginas Web sugeridas

https://www.ensembl.org/Felis_catus/Info/Index

<http://felinegenetics.missouri.edu/>

<https://source.wustl.edu/2014/11/the-cat-meow-genome-reveals-clues-to-domestication/>

El Genoma del cerdo

En el año 2003 se constituye el Consorcio Internacional para la secuenciación del genoma del cerdo (Swine Genome Sequencing Consortium, SGSC) integrado por representantes académicos, gubernamentales y de la industria porcina. El genoma del cerdo (*Sus scrofa*) comprende 18 autosomas y un par de cromosomas sexuales (X e Y). El tamaño del genoma es de 2.478 millones de pares de bases.

Este animal pertenece a los mamíferos de pezuña hendida (artiodáctilos) y se encuentra en un grupo evolutivo distinto a los primates; sin embargo su genoma presenta una abundante homología con el genoma humano siendo un modelo para

estudios biomédicos (enfermedades cardiovasculares, obesidad). Entre los años 2006 y 2009 el proyecto de secuenciación funcionó con fondos del Instituto Sanger de Cambridge mediante las técnicas de mapeo físico con clones bacterianos. En el año 2012 en la revista Nature se publica el ensamblaje del genoma del cerdo de una hembra de la raza Duroc. Utilizando las técnicas de Whole Genome Shotgun (WGS) y secuenciación de BAC (clonación en cromosomas artificiales de bacterias) lograron un primer borrador de alta calidad. En este trabajo se profundiza en la importancia de la funcionalidad y en el número de genes del olfato que tienen estos animales así como en la rápida evolución que han sufrido los genes relacionados con la respuesta inmune. Hay que tener en cuenta que los cerdos y humanos han compartido territorio durante más de 10.000 años con un complejo y estrecho vínculo en el proceso de domesticación. Para explorar el potencial del cerdo como modelo biomédico se estudiaron productos génicos, identificando 112 posiciones en común con el mismo aminoácido relacionadas con diversas enfermedades del humano. Cambios en estos sitios se han asociado con fenotipos tardíos para enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer o con aumento de riesgo a obesidad (*SDC3*, *ADRB3*) y diabetes (*SLC30A8*, *PPP1R4*, *ZNF615*). Estas y otras similitudes del genoma del cerdo por tener una fisiología muy similar al humano lo convierten en un modelo experimental de excelencia (Groenen *et al.*, 2012, Groenen, 2016).

Páginas Web sugeridas

https://www.ensembl.org/Sus_scrofa/Info/Index

<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/othervertebrates/pig.html>

<http://pig.genomics.org.cn/>

<http://comparativegenomics.illinois.edu/swine-genome-project>

<https://www.animalgenome.org/pig/>

<https://www.animalgenome.org/pigs/genome/>

<https://biopig.jimdo.com/>

El Genoma del caballo

Para la secuenciación de este genoma se tomó como referencia una hembra de raza Pura Sangre (*Equus ferus caballus*) de nombre “Crepúsculo” procedente de la Universidad de Cornell. El tamaño es de 2.428.790.173 de pares de bases y se han identificado 20.449 genes codificantes (Gráfico 1 y 3). El equipo de investigación que realizó la secuenciación y posterior ensamblaje comenzó a trabajar en el año

2006 y estuvo liderado por Lindblad-Toh del Instituto Broad del MIT y la Universidad de Harvard. En el año 2009 se publica en la revista Science el primer borrador de alta calidad de este genoma. El equino tiene una dotación de $2n=64$ cromosomas, con un sistema sexual XY como los demás mamíferos domésticos. En dicho borrador se observa que los cromosomas presentan pocos reordenamientos de sus segmentos con un 53% de grupos sinténicos conservados con relación al genoma humano. Las regiones centroméricas de los cromosomas en los mamíferos son estructuras complejas caracterizadas por tener ADN satélite repetido en tándem. Los datos aportados por el genoma equino mostraron que el par cromosómico 11 presenta la característica de estar desprovisto de ADN satélite centromérico. Esto podría responder desde el punto de vista evolutivo a que la función del centrómero surgiría en forma temprana antes de que se fuera acumulando el ADN satélite repetido. Se estaría viendo, por primera vez, una fotografía genética del nacimiento evolutivo de una estructura centromérica en mamíferos. A medida que los centrómeros evolucionan irían adquiriendo repeticiones en tándem de ADN satélite que contribuyen a la estabilidad funcional. El centrómero del cromosoma 11 sería una estructura “moderna” desde el punto de vista evolutivo siendo el único que carece de hibridación fluorescente “in situ” cuando se aplican sondas marcadas de ADN repetido de equino. Del genoma presentado en el 2009 también se generó información sobre la historia de la domesticación de esta especie que sería diferente al camino de domesticación del perro y más similar al bovino. Los equinos no parecen haber sufrido una domesticación estricta con cuello de botella sino que habría varias líneas matrilineales y pocas líneas patrilineales existiendo un fuerte sesgo sexual durante el proceso de domesticación.

Páginas Web sugeridas

http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Info/Index

<https://www.uky.edu/Ag/Horsemap/>

<https://www.broadinstitute.org/horse/horse-genome-project>

<https://www.genome.gov/20519480/2007-release-horse-genome-assembled/>

A modo de conclusión final podemos decir que la genómica se encuentra automatizada desde el aislamiento del ADN, clonación de insertos de ADN, protocolos de secuenciación y análisis donde interviene tecnología avanzada para acelerar los procesos (etapa de robotización).

Las empresas dedicadas a la secuenciación de ADN y servicios afines viven en una constante competencia financiera donde muchas de ellas cotizan en la NASDAQ (segunda bolsa de valores electrónica más importante de Estados Unidos). En la actualidad la empresa Illumina de San Diego-California es una de las líderes en el mercado de la secuenciación. Mediante las tecnologías generadas por este tipo de empresas (Illumina, Ion Torrent) durante los últimos 10 años, el coste de secuenciación se ha reducido notablemente. En el 2007 secuenciar el genoma humano tenía un coste aproximado de 1.000.000 de dólares mientras que a la fecha se habla de un coste de 1.000 dólares. El líder en secuenciación Illumina ya anunció la presentación de NovaSeq, un secuenciador de última generación donde el coste del genoma podría llegar a una cifra con dos ceros. Otro adelanto impensable hasta hace unos años es la denominada “secuenciación de bolsillo” que se encuentra liderada por la empresa inglesa Oxford Nanopore Technologies, que ha diseñado los denominados MinIon. Estos son mini secuenciadores portables que caben en la palma de la mano, pesan menos de 100 gramos y se conectan mediante un puerto USB a un ordenador. Con ellos se pueden secuenciar muestras de pacientes que estén infectados por distintas cepas de virus en lugares remotos brindando resultados en forma rápida para realizar un correcto tratamiento y decidir sobre medidas epidemiológicas a implementar. Los MinIon fueron utilizados en el 2015 en África Occidental (Guinea Ecuatorial) durante un brote de Ébola (EBOV) con fines de diagnóstico, caracterización viral, determinación de tasa evolutiva viral, caracterización de respuestas a vacunas y tratamientos. Gracias a este dispositivo los científicos pudieron realizar una vigilancia genómica en tiempo real y monitorear brotes en un lugar geográfico de escasos recursos con resultados en 24 horas y un tiempo de secuenciación viral de entre 15 a 60 minutos. Los MinIon y sus futuros sucesores también presentan muchas posibilidades para el desarrollo de la investigación en el campo de estudio de diversidad genética de seres vivos que se encuentran en lugares remotos del planeta.

Referencias bibliográficas

- Archibald AL, et al.**, 2010. Pig genome sequence – analysis and publication strategy. BMC Genomics 11, 438. doi: 10.1186/1471-2164-11-438
- Bombarely Gómez A.** 2014. Genomas y rompecabezas: una visión sobre el ensamblaje de genomas. Monografía N°150. aubombarely@gmail.com

- Groenen MA, et al., 2012.** Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*. Nov 15; 491(7424): 393–398. doi:10.1038/nature11622
- Groenen MA.** 2016. A decade of pig genome sequencing: a window on pig domestication and evolution. *Genet Sel Evol*.16 Mar 29;48:23. doi: 10.1186/s12711-016-0204-2.
- Humphray SJ, et al., 2007.** A high utility integrated map of the pig genome. *Genome Biol*. 8, R139. DOI: 10.1186/gb-2007-8-7-r139
- International Chicken Genome Sequencing Consortium.** 2004 Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432: 695–716.
- Jiang Y, et al., 2014.** The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. *Science*. Vol 344 Issue 6188.
- Lindblad-Toh K, et al., 2005.** Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803–819.
- Ortega JT, García LP.** 2011. El genoma bovino, métodos y resultados de su análisis. *Revista MVZ Córdoba Volumen 16(1):2410-2424.*
- Parker H, et al., 2017.** Genomic Analyses Reveal the Influence of Geographic Origin, Migration, and Hybridization on Modern Dog Breed Development., *Cell Reports* 19, 697–708.
- Pontius J, et al., 2007.** Initial Sequencing and comparative analysis of the cat genome. *Genome Research*. 17:1675–1689.
- The Bovine Genome sequencing and Analysis Consortium.** 2009. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. *Science*; 324:522-527.
- Wade CM, et al., 2009.** Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. *Science* vol 326 DOI: 10.1126/Science.1178158.
- Zhou Shiguo S, et al., 2015.** A clone-free, single molecule map of the domestic cow (*Bos taurus*) genome. *BMC Genomics* 16:644.DOI 10.1186/s12864-015-1823-7.



Capítulo II

LA BASE DE DATOS OMIA (ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS)

Una de las herramientas de gran utilidad para las Ciencias Veterinarias es la base de datos online OMIA (<http://omia.angis.org.au/home/>). La misma fue desarrollada por el Prof. Emérito Frank Nicholas de la Universidad de Sydney (Australia). A partir de la década de 1970 hubo un importante y continuo crecimiento de publicaciones científicas relacionadas con mecanismos de herencia y enfermedades en animales domésticos producto del desarrollo de la citogenética y genética molecular.

Este creciente número de publicaciones motivó a Nicholas a pensar en una manera de organizar electrónicamente la información que se venía generando.

Hay que recordar que los orígenes de Internet comienzan en la década de 1960 y a nivel académico en el año 1969 se realiza el primer enlace entre las Universidades de Stanford y UCLA a través de conexión telefónica.

En la especie humana, a comienzos de la década de 1960 ya había sido creada por McKusick una base de datos sobre desórdenes y características mendelianas (MIM, Mendelian Inheritance in Man). En sus orígenes mantuvo una continuidad durante 12 ediciones en formato libro entre los años 1966 al 1985. En el año 1985 con colaboraciones de la Biblioteca Nacional de Medicina y la Biblioteca Médica William H. Welch del Johns Hopkins de Estados Unidos, surge el catálogo en línea de genes humanos y trastornos genéticos conocido como la versión OMIN. Este catálogo ve la luz de disponibilidad global a través de Internet en 1987 (<https://www.omim.org/>).

Siguiendo la línea de pensamiento, Nicholas aspiraba crear una base de información de trastornos genéticos y de características heredables en animales

domésticos que pudiera ser accesible a nivel global y que la misma se pudiera actualizar. Conociendo la base OMIM contactó con McKusick con el que logró un entusiasta y constructivo aporte para el desarrollo de una base a la que denominó OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals).

En mayo de 1995 con el aporte del Servicio Australiano de Información Genómica (ANGIS) el contenido de OMIA fue accesible en línea. Desde el principio se pudieron interconectar ambas bases de datos (en sentido de OMIM a OMIA) pero es a partir de 1996, mediante la colaboración de Lipman del NCBI (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos) cuando se comienza a generar un medio automatizado de hipervínculos en la dirección inversa (de OMIA a OMIM). Como anécdota, en Estados Unidos durante el Gobierno del Presidente Obama, en octubre de 2013 (del 1 al 17 de octubre), se produjo uno de los denominados “Government Shutdown”, literalmente “paro del Gobierno” o más conocido como “cierre o apagón de la Administración pública” y a raíz de este suceso estas bases de datos quedaron inactivadas durante ese período.

Esto generó una brecha de incertidumbre en los investigadores durante el período de “apagón” de estas bases. Es aquí donde se pudo observar el impacto, la vulnerabilidad y la dependencia que se ha generado debido a la voluminosa información que se maneja en Internet, hablando estrictamente solo de temas académicos.

En OMIA se puede encontrar la mayor información de desórdenes y características con base genética en las siguientes especies en orden decreciente de información disponible: perros, bovinos, gatos, cerdos, ovinos, equinos, gallinas, conejos, cabras, codorniz japonesa y hámster dorado. A partir del año 2011 se utiliza una nomenclatura de tipo binomial para identificar una característica o desorden hereditario.

Esta nomenclatura consta de seis primeros dígitos que identifican a la característica seguidos de un guión y cuatro dígitos que están indicando la especie animal de acuerdo a la taxonomía del NCBI. A modo de ejemplo la sigla y los siguientes números: OMIA 002132-9615 se trata de aborto con letalidad embrionaria asociada al gen *BTBD17* (esto corresponde a los seis primeros dígitos) mientras que la especie sería *Canis lupus familiaris* o sea el perro doméstico (4 últimos dígitos de la nueva nomenclatura binomial). Otro ejemplo es el OMIA 000391-9913 donde los seis primeros números refieren a fragilidad del cromosoma sexual X del bovino y su posible relación con problemas de fertilidad mientras que 9913 corresponde a la especie *Bos taurus taurus*. Este último es uno de los muchos casos donde hay des-

conocimiento del mecanismo de herencia y del gen existiendo información de alteraciones cromosómicas.

En los últimos 12 años se ha podido apreciar un aumento importante de información sobre desórdenes y características anotadas en esta base de datos en distintas especies de animales domésticos (Gráfico 1).

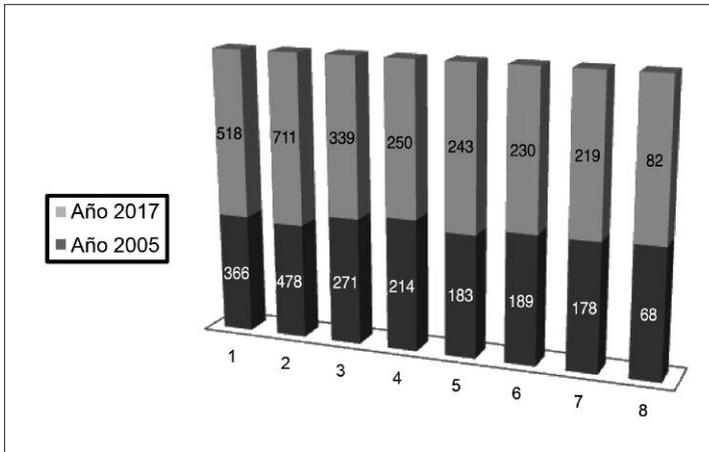


Gráfico 1: Incremento de la información registrada en animales domésticos en la base OMIA en los años 2005 y 2017. 1. Bovinos, 2. Perros, 3. Gatos, 4. Cerdos, 5. Ovinos, 6. Equinos, 7. Gallina, 8. Cabras.

El surgimiento de nuevas patologías genéticas puede ser explicado por la fuerte presión de selección que ha ejercido el hombre en la cría de animales domésticos. Un ejemplo es la cría de bovinos con fines productivos donde la reproducción puede ser controlada y el acervo genético de una raza puede estar muy influenciado por la utilización masiva de pocos reproductores.

En la década de 1990 se describió una enfermedad hereditaria de los bovinos que causó grandes pérdidas en la ganadería lechera a nivel mundial y se denominó BLAD (Deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina) OMIA 000595-9913. La expansión de la misma alrededor del mundo se debió al uso de reproductores portadores a través de la utilización de semen congelado. Esta es una enfermedad autosómica recesiva de la raza Holstein, donde los animales homocigóticos recesivos mueren a los pocos meses de nacer (2 a 8 meses) con una sintomatología clínica inespecífica por susceptibilidad extrema a infecciones.

A nivel molecular existe una mutación puntual en el gen *CD18* que codifica para una subunidad proteica que integra el complejo mayor $\beta 2$ integrina. Los neutrófilos al presentar la deficiencia de la $\beta 2$ integrina están impedidos de adherirse a los receptores de membranas de los vasos sanguíneos no realizando la diapédesis y la defensa extravascular. El origen y la difusión de esta enfermedad fue producto de la utilización, en centros de inseminación artificial de un excelente toro (Carlin M Ivanhoe Bell) e hijos de éste. A su vez se sabe que la mutación original del BLAD parte del abuelo paterno, el toro de élite Osborndale Ivanhoe.

Con OMIA si se desea profundizar en el estudio molecular de una patología hereditaria se accede directamente a otras bases de datos como:

1. *HomoloGene* que se encuentra dentro del NCBI y aporta conocimientos sobre genes homólogos con otras especies eucariotas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>).

2. *Ensembl* que se inició en el año 1999 como un proyecto con el objetivo de anotar automáticamente genomas, unir mediante links estas anotaciones con otros datos biológicos y posibilitar que toda esta información esté disponible en la Web de acceso público. Esta base comenzó a funcionar en el año 2000 antes de que se completara totalmente el Proyecto Genoma Humano. A partir de ese momento la expansión de esta base ha ido en aumento incluyendo datos de genómica comparativa, de variabilidad y de datos sobre regulación de los genomas (<http://www.ensembl.org/index.html>).

3. *Gene* que se encuentra dentro del NCBI y aporta conocimientos sobre genes en distintas especies en cuanto a nomenclatura, secuencias de referencia, rutas, mapas, variaciones y fenotipos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

El desarrollo de las distintas técnicas de secuenciación así como la utilización de diferentes marcadores moleculares en el marco de los distintos proyectos del Genoma de animales domésticos, permitió el descubrimiento de nuevas características y patologías con base hereditaria. A nivel histórico en el año 1987 se identificó la primera mutación puntual en una secuencia de ADN asociada al gen de la tiroglobulina (*TG*) que produce un tipo de bocio hereditario en bovinos. A partir de este momento se puede decir que durante la década de 1990 el desarrollo de la investigación en enfermedades hereditarias de especies domésticas se concentró en el desarrollo de mapas, utilizando los marcadores microsatélites también conocidos como STR (del inglés, short tandem repeats) o SSR (del inglés, simple sequence repeats). Los microsatélites son secuencias de ADN cortas, polimórficas y repetidas, una a continuación. Presentan una longitud de entre 2 a 10 pares de bases siendo más frecuentes las repeticiones de 2 a 6 pares de bases. La entrada al siglo XXI se

caracterizó por un acelerado ensamblaje de los genomas y el comienzo de utilización de otro tipo de marcadores moleculares como los SNP (del inglés: Single Nucleotide Polymorphism) o polimorfismos de un solo nucleótido que son variaciones de una sola base (A=adenina, T=timina, G= guanina o C=citosina) en la secuencia de ADN y se encuentran distribuidas por todo el genoma. El desarrollo posterior de chips de SNPs y la disminución de los costes de la tecnología de secuenciación permitió continuar acelerando el descubrimiento de mutaciones asociadas a patologías hereditarias en animales domésticos. En el año 2008 mediante uno de los primeros chips de SNPs (panel 25 K Affymetric SNP y panel 60K Illumina) se descubren dos enfermedades hereditarias en bovinos: distonía muscular congénita tipo 2, OMIA 001451-9913 y la Ictiosis congénita, OMIA 000547-9913. En el gráfico 2 se observa el incremento de características fenotípicas asociadas a distintos tipos mutaciones detectadas mediante técnicas de secuenciación de nueva generación o NGS (del inglés: Next Generation Sequencing) y análisis de asociación del genoma completo o GWAS (del inglés: Genome-wide association study) en bovinos. Un hito histórico presentado a finales del 2012 y que está propiciando este gran avance fue el proyecto 1000 genomas de toros donde se analizan por GWAS reproductores pertenecientes a distintas razas (<http://www.1000bullgenomes.com/>).

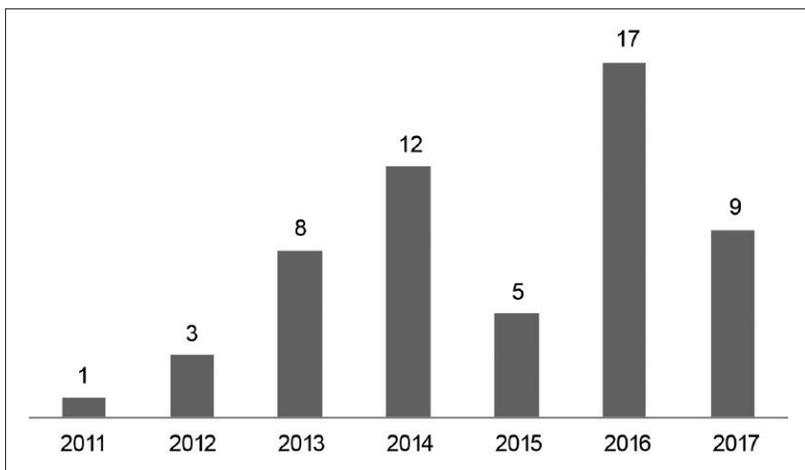


Gráfico 2: En una escala de años se observa el descubrimiento de mutaciones asociadas a características fenotípicas en bovinos utilizando NGS con paneles de SNP (64K Illumina, Bov SNP 50, Euro 610 K chip SNP).

Para finalizar y a modo de reflexión en esta época es casi imposible procesar y acceder a toda la información que se genera diariamente por lo que esta base de datos interconectadas acorta distancias en la búsqueda de enfermedades o rasgos genéticos en animales domésticos en modo online. En lo que va de este año la base fue visitada 27.142 veces por unos 15.879 cibernautas (Noviembre del 2017).

El Prof. Nicholas no solo ha contribuido a la comunidad académica con producción científica y con uno de los libros de cabecera para los genéticos dedicados a los animales domésticos (“Genética Veterinaria” Ed. Acricbia) sino que también ha sido un avanzado como creador de la base OMIA.

Sin embargo en medio del elevado número de bases de datos “*on line*” hay que tener cuidado y contar con un debido respaldo de información científica, ya sea, en formato electrónico o físico, por si ocurriera un “Shutdown” de tiempo indefinido.

Referencias bibliográficas

- Aguilar I**, Misztal I, Johnson DL, Legarra A, Tsuruta S, Lawlor TJ. 2010. Hot topic: a unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *J. Dairy Sci.* 93:743–52. doi: 10.3168/jds.2009-2730.
- Lenffer J**, *et al.*, 2006. OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals): an enhanced platform and integration into the Entrez search interface at NCBI. *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, Database issue D599–D601. doi:10.1093/nar/gkj152
- Llambí S**, Postiglioni A. 1994. Localization of the fragile X chromosome break points in Holstein-Friesian cattle (*Bos taurus*). *Theriogenology* 42:789-794.
- Nicholas FW**, Hobbs M. 2013. Mutation discovery for Mendelian traits in non-laboratory animals: a review of achievements up to 2012. *Anim. Genet* 45: 157–170. Doi: 10.1111/age.12103.
- Nicholas FW**. 2003. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA): a comparative knowledgebase of genetic disorders and other familial traits in non-laboratory animals. *Nucleic Acids Res*, Vol. 31 No. 1: 275–277.
- Rincón G**, Llambi S, Postiglioni A. 1997. Expression of X chromosome fragility in Holstein-Friesian cattle - a preliminary study. *Gen Sel Evol.* 29:395-401.



Capítulo III

INTERSEXUALIDAD EN ANIMALES DOMÉSTICOS

Determinación genética del sexo

En el mundo biológico se conoce una gran variedad de formas de reproducción y de ciclos biológicos. Sin embargo en la mayor parte de los organismos eucariotas diploides a los que pertenecen la mayoría de los animales domésticos, la reproducción sexual es el único mecanismo natural que da lugar a nuevos miembros de la especie.

La meiosis da lugar a gametos haploides, que más tarde con la fecundación, la descendencia que resulta mantiene el número diploide de cromosomas característico de la especie.

Lo que determina el sexo en estas especies es la presencia de los cromosomas sexuales, que en los mamíferos son los cromosomas X e Y, de tal forma que dos cromosomas X determinan el sexo femenino (hembras), al cual se le llama sexo homogamético, porque todos los gametos que se formen portan el cromosoma X y, en cambio en los machos el par sexual está constituido por un cromosoma X y un cromosoma Y, dando lugar al llamado sexo heterogamético. Pero esto que sucede en los mamíferos y en otras muchas más especies, no resulta ser así en las aves, en algunos anfibios y en algunos reptiles, como en las serpientes, en los cuales el sexo homogamético son los machos (ZZ) con un par sexual constituido por dos cromosomas Z y el sexo heterogamético son las hembras (ZW) con un cromosoma Z y otro cromosoma W.

Pero se pueden diferenciar diversos aspectos que contribuyen a que la determinación del sexo efectuada por los cromosomas del par sexual alcance el equilibrio

dándose un sexo u otro. Por ello se dice que en las especies de animales domésticos está el **sexo genético** (los genes y la presencia de los cromosoma XX en las hembras y XY en los machos; el **sexo gonadal** (ovarios o testículos), el **sexo hormonal** (estrógenos o andrógenos); el **sexo ductal** (derivados de conductos mesonéfricos y paramesonéfricos), el **sexo genital** (vagina o pene) y un **sexo de comportamiento** (comportamiento de macho o de hembra).

Por ello, y a pesar de que son los cromosomas sexuales X e Y son los que determinan que una gónada indiferenciada de un feto derive hacia ovario o hacia testículo para desarrollar una hembra o un macho, son los genes los que finalmente sirven de base subyacente para la determinación del sexo. Algunos de estos genes se encuentran localizados en los cromosomas sexuales, pero también hay genes que controlan características sexuales que se encuentran ubicados en los cromosomas autosómicos.

En los organismos pluricelulares es importante distinguir entre **diferenciación sexual primaria**, que implica sólo a las gónadas donde se producen los gametos y la **diferenciación sexual secundaria** que implica la apariencia global del organismo, como las glándulas mamarias y los genitales externos.

En los animales se dice que un individuo es unisexual cuando tiene solo órganos reproductores femeninos o masculinos y bisexual cuando tiene tanto órganos masculinos como femeninos. El término intersexo se reserva para aquellos que tienen una diferenciación sexual intermedia, siendo, por lo general, estériles. Tradicionalmente se ha utilizado el término intersexualidad como sinónimo de hermafrodita para describir animales cuyos órganos genitales tienen algunas características de macho y otras de hembra. Algunos autores (Hare y Singh, 1979) utilizan el término intersexo para describir aquellos animales cuyo sexo genético o cromosómico es diferente al gonadal.

El cromosoma Y determina la masculinidad en los mamíferos

El cromosoma sexual X tiene aproximadamente unos 1000 genes mientras que el cromosoma Y solo unas pocas decenas. La diferencia es muy notoria no solo numéricamente sino en el tipo de genes que transmiten a la descendencia. Estos cromosomas han tenido una evolución temprana en los mamíferos y se originaron de material genético de los autosómicos. A esta separación le siguió la restricción recombinatoria y la pérdida de genes en el cromosoma Y con el resultado de una notoria diferenciación morfológica del par sexual a nivel citogenético. Si bien la gran

mayoría de los genes en los cromosomas sexuales no tiene relación o no están vinculados al sexo, existe un “gran interruptor” o “llave interruptora” que es el locus de determinación del sexo masculino (Bachtrong *et al.*, 2014). Sin embargo como veremos más adelante existen excepciones en mamíferos que hacen dudar y dan por tierra el mito de la “llave interruptora” y poder ver lo compleja y diversa que es la determinación de sexo en animales.

En los mamíferos la presencia de los dos cromosomas X conduce a la diferenciación de ovario y de las vías genitales femeninas y la presencia del cromosoma Y es indispensable para la formación de un testículo funcional y para la diferenciación de los órganos genitales masculinos. El cromosoma Y contiene una serie de regiones entre las cuales se encuentra la correspondiente al llamado Factor de diferenciación testicular (*TDF*) responsable, como su propio nombre indica, de la diferenciación de la gónada hacia testículo en el feto, durante el desarrollo embrionario. Se trata de una región muy conservada en la evolución, está presente en la mayoría de las especies de mamíferos, se expresa a lo largo del desarrollo embrionario, justo en el momento de diferenciación de las gónadas, se expresa específicamente en los machos y las alteraciones que pueda sufrir determinan un gran número de anomalías y patologías en los portadores.

El control genético que ejerce el cromosoma Y es dominante, como se verá más adelante en el apartado de anomalías cromosómicas en el par sexual. Basta que esté presente para que se induzca masculinidad y si por el contrario, está ausente, esa gónada derivará hacia ovario, es decir su ausencia induce feminidad. Los animales con una dotación de un solo cromosoma X (*X0*), o con *XX*, *XXX* e incluso *XXXX*, presentan fenotipo femenino, mientras que los animales con *XY*, *XXY*, *XXXY* e incluso *XXXXY*, presentan fenotipo masculino.

En la meiosis se produce el emparejamiento de los cromosomas homólogos para dar lugar al mecanismo de la recombinación genética y aunque el cromosoma X y el Y no son homólogos, ambos presentan pequeñas regiones homólogas, denominadas regiones pseudo-autosomales, en los brazos cortos de cada uno de ellos. Una de estas regiones, con una longitud de 0,4 a 0,8 μ , comprende la región telomérica del brazo corto del cromosoma X y entre un 11 a un 56 % del brazo corto del cromosoma Y. Lo más importante desde el punto de vista genético, es que puede haber recombinación entre ambos cromosomas, justamente a nivel de estas regiones pseudo-autosomales, aumentando la variabilidad genética en este caso. (Figura 1).

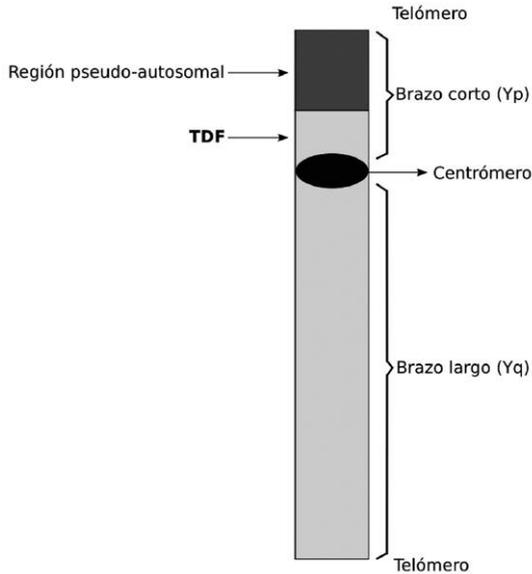


Figura 1: Representación del cromosoma Y submetacéntrico, con un brazo corto (Yp) y un brazo largo (Yq). El cromosoma termina con los telómeros y la unión entre ambos brazos se realiza mediante el centrómero.

El cromosoma Y juega un papel esencial no solo en el desarrollo del sexo masculino, sino también en la espermatogénesis y la fertilidad del macho. En la parte distal del brazo corto (Yp) se encuentra la región pseudo-autosomal (PAR) y el resto del brazo corto, así como el brazo largo (Yq) contienen secuencias específicas masculinas (MSY). Estas dos regiones tienen propiedades genéticas contrastantes. Los pares de cromosomas X e Y se recombinan en la región PAR durante la etapa de paquíteno de la primera división meiótica masculina, mientras que no lo hacen las regiones específicas de X y de Y. La región MSY, que comprende el 95% del contenido de ADN del cromosoma Y, puede dividirse además en dos regiones, eucromática y heterocromática. La región eucromática alberga todos los genes de la región específica masculina (RMS), mientras que la región heterocromática contiene secuencias repetitivas específicas del Y. La ausencia de recombinación con el cromosoma X en la región MSY durante la meiosis, así como la abundancia de secuencias repetitivas específicas del Y, la tendencia de sus genes a degenerarse durante la evolución y la coherencia funcional de su contenido de genes en el desa-

rollo masculino, la espermatogénesis y la fertilidad, constituyen algunas de las características del cromosoma Y.

Estructuralmente, el cromosoma Y bovino es el cromosoma más pequeño del genoma, comprende aproximadamente el 1.7 % del genoma haploide. El tamaño estimado es aproximadamente de 51 Mb (3000 x 1.7%). Con relación a la inexcusable presencia del cromosoma Y para que se determine el sexo de un embrión de mamífero, es de señalar que Otake y Kuroiwa (2016) han demostrado que los genes clave que determinan el sexo siguen operando en la especie de mamífero *Tocudaia osimensis* (la rata espinosa de la isla de Okkaido) aún cuando carece del cromosoma Y, lo cual lleva un paso más lejos en la comprensión de la diferenciación sexual.

El gen *SRY* ha sido bien investigado y se sabe que activa varios genes reguladores, como *Sox9* y *AMH*, que tienen un papel importante en la diferenciación masculina. Este gen se piensa que tiene en mamíferos una edad evolutiva de 180 millones de años.

Otake y Kuroiwa sugieren que, a pesar de que no esté presente el cromosoma Y y por consiguiente el gen *SRY* en *T. osimensis*, los genes regulados por *SRY* están presentes y funcionan como lo hacen en otros mamíferos placentarios.

Este roedor es un ejemplo biológico de la presencia de machos con ausencia completa de cromosoma Y.

El gen *SRY* inicia la transcripción del gen *SOX9* en el reborde genital del embrión XY, y una regulación al alza de la expresión de dicho gen da lugar a las células de Sertoli, proporcionando el desarrollo de testículos.

Estos investigadores demostraron que las regulaciones de los genes *SOX9* y *AMH* están altamente conservadas en las especies que tienen el gen *SRY* ausente, al igual que las cascadas moleculares implicadas en la diferenciación sexual masculina.

Genes en el cromosoma Y bovino

De acuerdo con Ponce de León y Liu (2012) en el cromosoma Y de bovino hay aproximadamente más de 260 marcadores, entre los que se encuentran más de 50 microsátélites, 10 genes/EST y aproximadamente 200 BES (secuencias del cromosoma Y clonadas en cromosomas artificiales de bacterias). Entre las 156 unidades de transcripción en la MSY humana, 78 son genes codificadores de proteínas que codifican colectivamente a 27 proteínas (18 genes de copia única y 9 familias de genes) distintas. Las 78 unidades de transcripción restantes son transcripciones no codificantes. Estos genes que codifican proteínas se clasifican en cuatro grupos.

El Grupo I contiene el gen (*SRY*) que está involucrado en la determinación del sexo y se conserva entre todos los mamíferos estudiados hasta el momento.

El grupo II contiene 15 genes (*EIF1AY*, *CYorf15A y 15B*, *DBY*, *NLGN4Y*, *PCDH11Y*, *PRKY*, *USP9Y*, *RPS4Y1*, *RPS4Y2*, *SMCY*, *TBL1Y*, *TGIF2LY*, *TMSB4Y*, *ZFY* y *UTY*) que son de una sola copia. Cuatro de ellos (*USP9Y*, *DBY*, *UTY* y *TMSB4Y*) están agrupados y juegan un papel significativo en la espermatogénesis y el desarrollo del tamaño corporal. El resto de los genes en este grupo tienen funciones de “limpieza”.

El grupo III contiene dos genes (*AMELY* y *GCY*) que se han propuesto relacionados con el control del crecimiento embrionario, la estatura y el desarrollo de los dientes.

El grupo IV contiene nueve genes (*RBMY*, *DAZ*, *TSPY*, *CDY*, *BPY2*, *XKRY*, *PRY*, *HSFY* y *VCY*).

Hasta la fecha, se han analizado un total de 14 ortólogos (*ANT3*, *CSF2RA*, *STS*, *AMELY*, *ASMT*, *RBM1A1*, *SMCY*, *ZFY*, *SRY*, *TSPY*, *DBY*, *HSFY*, *DAZ* y *CDY*) de genes humanos relacionados con el cromosoma Y en el ganado. Cuatro (*ANT3*, *CSF2RA*, *STS*, *AMELY*) de estos genes están localizados en la PAR, los genes restantes en la RMS.

Las familias de genes *DAZ* y *CDY* no están presentes en el cromosoma Y bovino, mientras que sus copias autosómicas, *DAZL*, *CDYL* y *CDYL2*, sí existen en el genoma bovino. Los genes *AMEL* bovinos están ubicados en los cromosomas X e Y y se expresan solo en los brotes de los dientes.

El gen *SRY* bovino codifica para una proteína de 229 aminoácidos. La estructura del gen *SRY* bovino muestra una gran semejanza con el *SRY* humano. El gen *TSPY* bovino contiene siete exones y codifica para una proteína de 317 aminoácidos. Ambos genes *SRY* y *TSPY* se expresan solo en testículos bovinos.

El gen *DBY* codifica para una proteína de 660 aminoácidos, con una similitud del 88 y 89% con el humano y el orangután y se expresa solo en testículos bovinos. (Ponce de León y Liu, 2012).

Hasta el momento, se han identificado 1274 genes en la región específica masculina (RSM) del cromosoma Y bovino, en comparación con los 31 a 78 genes asociados en los cromosomas Y de varios primates. Se sabe que los genes en el cromosoma Y bovino son mucho más activos transcripcionalmente en comparación con otros mamíferos. La transcripción es el primer paso de la expresión génica cuando se copia el ADN. En este proceso, la célula produce ARN mensajero que copia la información genética del núcleo de la célula para servir como plantilla para la síntesis de proteínas.

También se han identificado 375 familias de genes no codificantes que se expresan predominantemente en diferentes etapas de la actividad testicular.

Estos resultados contradicen directamente la visión tradicional de que el cromosoma Y está constituido en gran parte por heterocromatina con una escasez de genes y actividad de transcripción.

Como ya es sabido, los genes ligados al cromosoma Y que rigen la fertilidad del macho, únicamente se heredan a través de la línea masculina.

Patologías de la determinación del sexo en animales

Cuando en la especie humana se han analizado los cromosomas X e Y desde el punto de vista molecular, se ha visto que en un 60% de hombres 46, XX se identificaron fragmentos de ADN de longitud variable procedentes del cromosoma Y; y por otra parte, en la mayoría de las mujeres 46, XY se observaron deleciones de fragmentos de ADN de ese cromosoma Y. Este fenómeno se explica por la presencia de recombinación genética anómala entre las regiones homólogas de ambos cromosomas sexuales, mediante la cual la región TDF del cromosoma Y se incorpora al cromosoma X y dicha región se pierde en el cromosoma Y. (Cotinot *et al.*, 1991). (Figura 2).

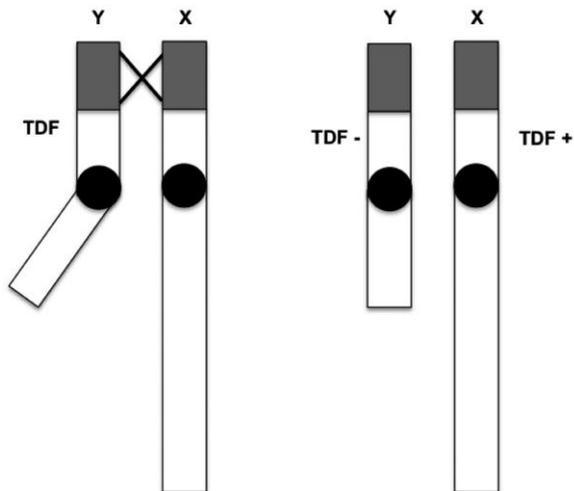


Figura 2: Proceso de recombinación genética entre las regiones homólogas de los cromosomas X e Y, cuando sucede una recombinación desigual, incorporando junto con la región homóloga del Y una pequeña región de la TDF, quedando como resultado un cromosoma X con esta región y un cromosoma Y carente de la misma.

En humanos la región TDF ha sido clonada y se ha identificado el gen *ZFY* localizado en la región del brazo corto del cromosoma Y. Este gen codifica para proteínas denominadas “dedos de zinc” (Page *et al.*, 1987) implicadas en los procesos de activación de la transcripción y aunque se ha pensado que podría ser el gen candidato para ser el factor de diferenciación testicular, esta idea ha sido desechada porque existe un gen homólogo *ZFX* ubicado en el cromosoma X que no experimenta inactivación en el proceso de compensación de la dosis génica experimentado por las hembras XX, con lo cual dicho gen se expresa en todos los tejidos de las hembras. También se sabe que en los animales marsupiales este gen *ZFY* no se encuentra en el cromosoma Y, sino en los autosomas. Y finalmente, la idea de que el gen *ZFY* no es el factor de diferenciación testicular lo corrobora el hecho de que los varones XX que presentan la región del cromosoma Y, como se ha indicado anteriormente, en dicha región nunca se ha identificado el gen *ZFY*.

En la región TDF se ha caracterizado otro gen interesante es el gen *SRY*, presente en varones XY normales y también en muchos machos XX y en hermafroditas verdaderos con XX y ausencia del gen *ZFY*. Está ausente de las hembras XX normales y en muchas hembras XY.

Por eso en los modelos de determinación del sexo, se sigue apoyando la idea de que es la presencia del cromosoma Y lo que determina el sexo masculino, ya que en todos los machos XX se ha observado que al menos, poseían una pequeña región del cromosoma Y, más o menos amplia. Y desde luego, se ha demostrado que donde primero se expresa este gen es en las células de Sertoli, porque ellas son las primeras células que se diferencian en el seno del primordio gonadal. En animales quiméricos XX/XY, se ha observado que las células de Sertoli son siempre XY (Cotinot *et al.*, 1991).

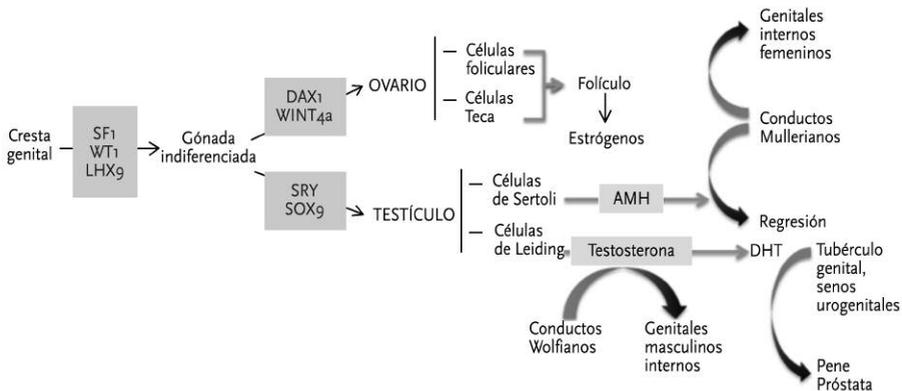


Figura 3: (basada en Gilber y Sutherland, 2000). Cascadas postuladas que conducen a la formación de fenotipos sexuales en mamíferos. La conversión de la cresta genital en la gónada indiferenciada requiere los genes SF1, WT1 y LHX9, ya que los machos que carecen de estos genes carecen también de gónadas. La gónada indiferenciada parece decantarse hacia la vía femenina (desarrollo de ovario) por los genes DAX1 y WNT4 y hacia la vía masculina (desarrollo de testículo) por el gen SRY (en el cromosoma Y) junto con genes autosómicos como SOX9. El ovario produce células de Teca y células de la granulosa, que juntas son capaces de sintetizar estrógenos. Bajo la influencia del estrógeno (primero de la madre, luego de las gónadas fetales), el conducto de Müller se diferencia en los genitales femeninos, y la descendencia desarrolla las características sexuales secundarias de una hembra. El testículo produce dos hormonas principales. El primer factor de conducto anti-Müller (AMH) hace que el conducto mülleriano retroceda. El segundo, la testosterona, causa la diferenciación del conducto de Wolff en los genitales internos masculinos. En la región urogenital, la testosterona se convierte en dihidrotestosterona (DHT) y esta hormona causa la morfogénesis del pene y la próstata.

Uno de los genes autosómicos implicados en la determinación del sexo es el gen *SOX9* que es un factor de transcripción. Los embriones humanos que presentan doble copia de *SOX9* se desarrollan como varones, a pesar de carecer del gen *SRY* (Huang *et al.*, 1999). Las personas con una sola copia funcional de este gen manifiestan el síndrome llamado Displasia Campomelic. Aproximadamente el 75% de los pacientes XY con síndrome Campomelic se desarrollan fenotípicamente como hembras o hermafroditas. El gen *SOX9* tendría un rol esencial en la formación de testículos. El homólogo de ratón de este gen, *Sax9*, se expresa en las crestas genitales masculinas (XY), no habiendo expresión en las femeninas (XX). Además, las mismas células de la cresta genital que expresan *Sax9* van a expresar a *Sry* aunque primero se enciende *Sry* y luego *Sax9*. El *Sry* se encuentra en mamíferos marsupiales y placentarios y se piensa que *Sax9* puede ser un gen de determinación del sexo más antiguo y más central hablando en términos evolutivos.

El factor de transcripción *SF1* es una proteína que puede ser activada directa o indirectamente por *SRY* y actúa para que la gónada sea indiferenciada en un principio. Cuando los niveles de *SFI* disminuyen en la cresta genital de los embriones XX, el gen *SFI* permanece activo en el testículo en desarrollo, participando en la masculinización de las células de Leydig y Sertoli. En las células de Sertoli, el gen *Sax9* en colaboración con el gen *SFI*, son necesarios para elevar los niveles de transcripción AMH. En las células de Leydig, el gen *SFI* activa los genes que codifican las enzimas que producen testosterona. Se cree que *SRY* (directa o indirectamente) activa al gen *SF1* y la proteína SF1 activa, más tarde, a ambos componentes de la vía de diferenciación sexual masculina.

Y ¿qué es lo que determina la formación de ovarios?

En 1980, Bernstein *et al.*, en dos pacientes hermanas ambas genéticamente XY con los cromosomas Y normales, pero tenían una duplicación de una pequeña porción del brazo corto del cromosoma X. Se encontraron casos posteriores y se concluyó que si había dos copias de esta región en el cromosoma X activo, la señal *SRY* revertía. Estos autores propusieron que esta región contiene un gen para una proteína que compite con el factor *SRY* y que es importante para dirigir el desarrollo del ovario. En el desarrollo testicular, este gen sería suprimido, pero tener dos copias activas del gen anularía esta supresión. Este gen, es el gen *DAX1*, que ya está clonado demostrándose que codifica para un miembro de la familia de receptores de hormonas nucleares. El gen *Dax1* se expresa en las crestas genitales del embrión poco después de la expresión del gen *Sry*. Parece que *DAX1* antagoniza la función de *SRY* y regula negativamente la expresión de *SF1*. Por lo tanto, *DAX1* es probablemente un gen que participa en la determinación del ovario.

El gen *WNT4* es otro gen que puede ser crítico en la determinación del ovario. Este gen se expresa en el reborde genital del macho mientras aún se encuentra en su etapa de gónada indiferenciada. La expresión de *WNT4* se vuelve indetectable en las gónadas XY (que se convierten en testículos), mientras que se mantiene en XX gónadas a medida que comienzan a formar ovarios. En ratones XX transgénicos que carecen de los genes *WNT4*, el ovario no se forma adecuadamente y sus células expresan marcadores específicos de testículo, que incluyen enzimas que producen AMH y testosterona. El gen *Sry* puede formar testículos al reprimir la expresión de *WNT4* en el reborde genital, y al promover *SF1*. (Figura 4).

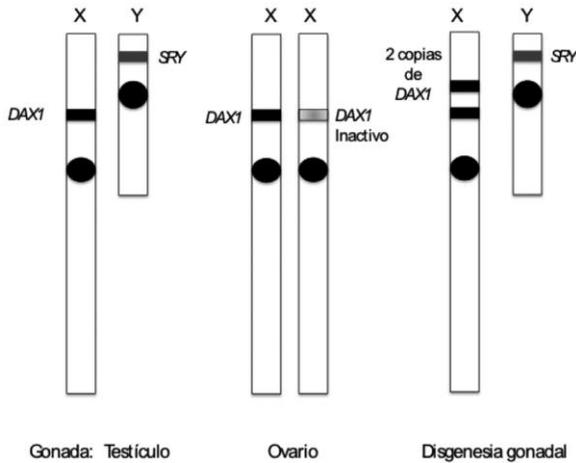


Figura 4: Reversión de sexo en humanos con dos copias del locus DAX1.

DAX1 (en el cromosoma X) más SRY (en el cromosoma Y) produce testículos. DAX1 sin SRY (dado que el otro locus DAX1 está en el cromosoma X inactivo) produce ovarios. Dos copias activas de DAX1 (en el cromosoma X activo) más SRY (en el cromosoma Y) conducen a una gónada mal formada. Como la gónada no produce ni AMH ni testosterona, el fenotipo es femenino.

Debe tenerse en cuenta que el desarrollo de testículos y ovarios son procesos activos. En la determinación de sexo primario de mamíferos, ninguno es un “estado predeterminado”. Aunque se han realizado progresos notables en los últimos años, todavía no se sabe cómo actúan y cuales son los genes determinantes de testículos u ovarios, y el problema de la determinación primaria del sexo sigue siendo uno de los grandes problemas no resueltos de la biología.

La determinación primaria de sexo implica la formación de un ovario o un testículo a partir de la gónada indiferenciada. Esto, sin embargo, no da el fenotipo sexual completo. La determinación secundaria del sexo en mamíferos implica el desarrollo de los fenotipos femeninos y masculinos en respuesta a las hormonas secretadas por los ovarios y los testículos. Tanto la determinación del sexo secundario femenino como masculino tienen dos fases temporales principales. El primero ocurre dentro del embrión durante la organogénesis; el segundo ocurre cuando el individuo ya nacido madura sexualmente.

Si las gónadas indiferenciadas se eliminan de un mamífero embrionario, entonces se da el fenotipo femenino: los conductos paramesonéfricos se desarrollan mientras los conductos mesonéfricos se degeneran. La formación del fenotipo masculino implica la secreción de dos hormonas testiculares. La primera es AMH, producida por las células de Sertoli que causa la degeneración del conducto paramesonéfrico (conductos de Müller). La segunda es la testosterona esteroide, que se secreta desde las células fetales de Leydig. Esta hormona hace que los conductos mesonéfricos o de Wolff se diferencien en epidídimo, el conducto deferente y las vesículas seminales, y causa que las hinchazones urogenitales se desarrollen en el escroto y el pene.

La existencia de estos dos sistemas independientes de masculinización es demostrada por individuos con **síndrome de insensibilidad a los andrógenos**. Que aunque son XY (+ gen *SRY*) tienen testículos que producen testosterona y AMH. Sin embargo, carecen de la proteína receptora de testosterona y, por lo tanto, no pueden responder a la testosterona producida por sus testículos. Por ser capaces de responder al estrógeno producido en sus glándulas suprarrenales, desarrollan el fenotipo femenino. Sin embargo, a pesar de su apariencia como hembras, tienen testículos, y aunque no pueden responder a la testosterona, producen y responden a la AMH. Por lo tanto, sus conductos Müllerianos degeneran. Se desarrollan como hembras normales pero estériles, carecen de útero y oviductos y tienen testículos intra-abdominales.

Además de la testosterona, las células de Leydig secretan la hormona similar a la insulina 3 (*InsI3*). Esta hormona es necesaria para el descenso de las gónadas hacia el escroto. Los machos que carecen de esta hormona son infértiles porque los testículos no descienden. En las hembras, la falta de esta hormona desregula el ciclo menstrual.

El estrógeno es necesario para el desarrollo completo de los conductos mülleriano y wolffiano (conductos paramesonéfricos y mesonéfricos). En las hembras, el estrógeno secretado por los ovarios fetales parece suficiente para inducir la diferenciación del conducto de Müller en sus diversos componentes: el útero, los oviductos y el cuello uterino. La extrema sensibilidad del conducto de Müller a los compuestos estrogénicos se demuestra por los efectos teratogénicos del dietilestilbestrol (DES), un potente estrógeno sintético que puede causar infertilidad al cambiar el patrón del conducto de Müller.

En los machos, el estrógeno es realmente necesario para la fertilidad. Una de las funciones de las células del conducto eferente es absorber aproximadamente el 90% del agua del lumen de la rete testis. Esto concentra los espermatozoides, dán-

doles una vida más larga y proporcionando más espermatozoides por eyaculación. Esta absorción de agua está regulada por el estrógeno. Si el estrógeno o su receptor está ausente en ratones, esta agua no se absorbe y el ratón es estéril.

Los mecanismos del desarrollo mamario

El tejido mamario tiene un modo de desarrollo sexualmente dimorfo. La testosterona inhibe el desarrollo de las mamas, mientras que el estrógeno lo promueve.

Intersexualidad

Como se ha indicado anteriormente, el término intersexo se utiliza como sinónimo de hermafrodita, para describir animales cuyos órganos genitales tienen algunas características de hembra y algunas de macho. Las condiciones de intersexo se han descrito en varias especies de animales domésticos. Los hermafroditas verdaderos son raros y tienen tejido ovárico y testicular y exhiben anomalías de los genitales externos. La composición cromosómica es variable y puede ser una quimera, un mosaico o desconocido. El pseudohermafroditismo, a menudo denominado síndrome de reversión sexual, es más común. Los animales tienen uno u otro tipo de gónada y genitales externos del sexo opuesto. Los animales pueden ser XY *SRY* negativos o XX *SRY* negativos. En caballos, el tipo más común es 64XY *SRY* negativo. Se cree que algunos casos de inversión sexual se deben a una mutación recesiva del gen autosómico.

Debido al papel crucial de los cromosomas sexuales (especialmente el cromosoma Y) en la determinación del sexo, los trastornos del desarrollo sexual en los animales domésticos son cuestiones importantes de analizar por la especial incidencia que presentan tanto dando lugar a un descenso de la producción, como por el equilibrio genético en los animales portadores.

La determinación del sexo de los mamíferos es un proceso muy complejo, en el cual están involucradas cromosomas sexuales y docenas de genes. La mayoría de estos genes se localizan en autosomas, y otros residen en los cromosomas sexuales, como la región *SRY* determinante del sexo ubicada en el cromosoma Y, y *AR* (receptor de andrógenos), involucrado en el desarrollo de conductos wolffianos y genitales masculinos externos, situado en el cromosoma X. Curiosamente, genes cruciales para la diferenciación de ovarios, como los genes *RSPO1*, *CTTNB1*, *WNT-4* y *FOXL2*, están localizados en autosomas. El par cromosómico sexual comprende quimerismos, aneuploidías, y reordenamientos estructurales.

Quimerismo

Una quimera se define como la presencia de dos dotaciones genéticas diferentes, en un mismo individuo, procedentes de diferentes cigotos. Las quimeras son frecuentes en partos gemelares y la experimenta uno de los hermanos que comparte células con su hermano gemelo. El caso mejor conocido es el llamado Freemartiniismo bovino, en el que una hembra nacida gemela de un ternero, presenta en su torrente sanguíneo leucocitos XX y leucocitos XY, por haber experimentado un intercambio de células sanguíneas en la circulación placentaria entre los dos fetos hermanos de diferente sexo. El examen citogenético presenta patrones de cromosomas XX y XY en los leucocitos de una hembra freemartins, lo que muestra dicho intercambio de células.

Como consecuencia de la anastomosis vascular que se produce entre los dos embriones heterosexuales, ambos individuos son quimeras, ya que cada uno de ellos recibe células del otro. En el caso de las hembras freemartins, hay intercambio de células hematopoyéticas que permanecen activas durante el resto de la vida del animal. Si se estudian las poblaciones leucocitarias se distinguen fácilmente los cromosomas sexuales. De esta forma, tanto en el macho como en la hembra, se pone de manifiesto este quimerismo por la existencia de células tanto XX como XY.

La presencia de estas células con diferente dotación genética a la suya, en concreto la presencia del cromosoma Y de su hermano, le produce grados variables de inversión de sexo de hembra a macho de los genitales internos y externos. Los órganos genitales tubulares van desde bandas en forma de cordón hasta cuernos uterinos casi normales. Las hembras Freemartins tienen una vagina corta que termina ciegamente sin comunicación con el útero. El cuello uterino está ausente. Los ovarios generalmente no se desarrollan y permanecen pequeños. La anastomosis vascular de las placentas coriónicas de los dos fetos da como resultado la transferencia de la hormona antimülleriana del feto masculino al femenino, lo que inhibe el desarrollo del tracto femenino.

En el gemelo macho bovino, se detecta quimerismo, pero estos machos normalmente se desarrollan sin signos de desequilibrios en el desarrollo sexual. El síndrome de Freemartiniismo se produce con una cierta frecuencia en ganado bovino, pero también se ha descrito en ovejas, cabras, y camélidos entre otros mamíferos.

Causa esterilidad en hembras nacidas gemelas con machos; aproximadamente el 92% de todas las novillas nacidas co-gemelas de terneros machos son estériles.

Las hembras nacidas únicas y que sin embargo presentan el síndrome Freemartin se cree que son el resultado de la muerte en el útero del hermano gemelo.

Ponz y Arruga (2003), estudiaron una hembra ovina de raza Rasa Aragonesa, inscrita en el Libro Genealógico de la raza. No apreciaron caracteres morfológicos extraños en su calificación racial y fue elegida como animal de reposición. Al año de vida se apreciaron dos bolsas inguinales a modo de testículos, se constató la presencia de una vagina acortada, aspecto anormal de la vulva, con un clítoris de sobredimensionado y masculinización de la cara. (Figuras 5 y 6). El número cromosómico normal del ovino es $2n=54$, XX las hembras y $2n=54$, XY los machos.



Figura 5: Vista posterior del animal: clítoris abultado y las bolsas escrotales (de Ponz y Arruga, 2003).



Figura 6: Bolsas escrotales (de Ponz y Arruga, 2003).

El animal presentó un cariotipo típico de Freemartin, con un 31% de células XX y 69% de células XY. (Figura 7).

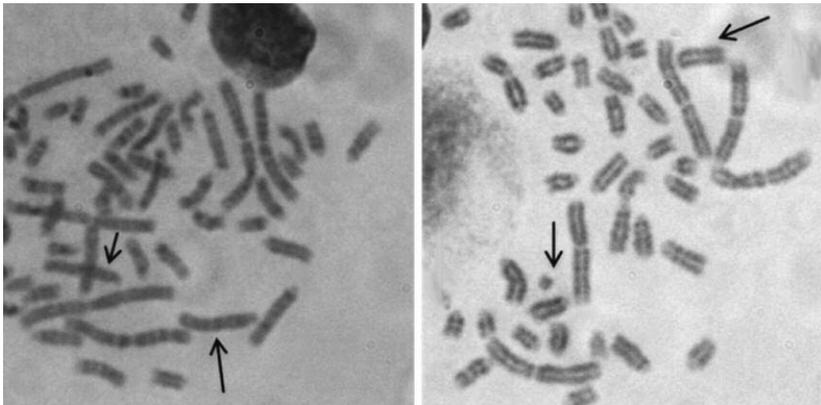


Figura 7: A la izquierda una metafase XX y a la derecha una metafase XY (de Ponz y Arruga, 2003).

El alto porcentaje de células 54, XY sorprende en estos casos de Freemartiniismo, pero no está correlacionado con el porcentaje de masculinización del animal. La baja incidencia de animales Freemartin en ovino, no hace pensar en este síndrome como causa de infertilidad. No obstante se debe vigilar este problema en razas ovinas que son seleccionadas por su prolificidad, donde se buscan los partos dobles como objetivo de selección.

Hoy en día los animales transgénicos y los modificados genéticamente (GM) pueden considerarse como quimeras, puesto que presentan información genética diferente en sus diferentes tejidos y células y esta información genética procede de otro cigoto e incluso de otra especie que puede ser, incluso, muy alejada evolutivamente.

Mosaicismo

El mosaicismo implica una diferente dotación genética en diferentes tejidos de un mismo individuo, originadas a partir de un solo cigoto. El caso mejor conocido es el proceso de compensación de la dosis génica de las hembras de los mamíferos. Las hembras de los mamíferos tienen en su par cromosómico sexual

XX. Como señalara Lyon (1961), en los mamíferos, la compensación de dosis génica se consigue por inactivación al azar en el embrión de uno de los dos cromosomas X de las hembras.

La incidencia del mosaicismo es frecuente en animales con aneuploidías cromosómicas sexuales; por ejemplo, la mayoría de las yeguas infértiles con monosomía X son mosaicos con dos líneas celulares: normal (64, XX) y monosómica (63, X) (Szczerbal y Switonski, 2016).

El mosaicismo y el quimerismo se diagnostican comúnmente en animales con trastornos del desarrollo sexual. Por lo tanto, la identificación de dos o más líneas celulares es un importante problema de diagnóstico. Dado que la incidencia de la segunda línea celular puede ser baja, su detección requiere análisis de una gran cantidad de extensiones metafásicas. Por ejemplo, para excluir la presencia de otra línea celular a un nivel de, por ejemplo, 3% (con una confianza del 95%), se deben analizar 100 extensiones de metafase. Además, se requiere el análisis molecular de marcadores genéticos, por ejemplo, microsatélites, para distinguir entre linfocitos y quimerismo de cuerpo entero (Hook, 1977).

La incidencia del freemartinismo ha ampliamente estudiada en ovejas, y el diagnóstico mediante un estudio cromosómico, dio iuna incidencia de intercambio del 5% XX/XY (Brace *et al.*, 2008). Los estudios en cabras también indican que la frecuencia de freemartins es similar a la de las ovejas (Szatkowska *et al.*, 2004).

También se observado quimerismo de linfocitos XX/XY en hembras de caballos (Juras *et al.*, 2010) cerdos (Barasc *et al.*, 2014) y perros (Szczerbal *et al.*, 2014).

Aneuploidías

Las aneuploidías compatibles con la vida son las monosomías (un solo cromosoma en el par sexual, en este caso, siempre el cromosoma X (X0), ya que no se ha identificado ningún ser vivo carente de cromosoma X; y las trisomías (tres representantes cromosómicos en el par sexual: XXX, XXY, XYY).

Los efectos más nocivos sobre el desarrollo sexual, que conducen a la esterilidad, son causados por la monosomía X y la trisomía XXY. La incidencia de aneuploidías cromosómicas sexuales no es uniforme en todas las especies.

La monosomía X es más común en yeguas, bastante rara en perros y gatos, y muy rara en vacas y cerdos (Szczerbal y Switonski, 2016).

La incidencia de la monosomía X se evaluó en un estudio en caballos jóvenes y fenotípicamente normales (Bugno *et al.*, 2007) y se identificaron ocho yeguas con

monosomía X, mientras que todos los machos tenían un cariotipo normal. Este estudio confirmó que la monosomía X es la causa más importante de desequilibrio sexual equino. En el ganado vacuno, esta aneuploidía es bastante poco frecuente se ha descrito un segundo caso de en una novilla Longhorn de 3 años con genitales externos normales, un útero subdesarrollado y gónadas no identificables por ultrasonografía rectal (Romano *et al.*, 2015). Se diagnosticaron varios casos de monosomía X en perros y gatos (Meyers-Wallen, 2012) y monosomía felina X (Szczerbal *et al.* 2015). Este animal presentó un fenotipo virilizado, manifestado por un pene rudimentario y una estructura similar al escroto. Curiosamente, el examen histológico de la gónada reveló la presencia de cuerpos lúteos y folículos primordiales.

La trisomía XXY se diagnostica con bastante poca frecuencia, con la excepción de los gatos machos carey. El número normal cromosómico de los gatos es de $2n=38$.

En el caso de los gatos tricolores, se encuentran los colores blanco y después los moteados de colores naranja o amarillo, que en algunos lugares ese color se denomina de concha de tortuga (carey) y el color negro. Estos genes que dan lugar al color negro y amarillo o carey, están ubicados en el cromosoma X. Por eso, las hembras (XX) pueden expresar en su pelaje ambos colores conjuntamente (porque pueden llevar un X con el color negro y el otro X con el color dorado, cuando sean heterocigóticas para estos genes del color) y, por el contrario, los machos por tener un solo cromosoma X (XY), o bien serán con el color negro y el blanco, o bien con el color carey y el blanco, según el gen que hayan recibido de sus madres. Pero se dan con cierta frecuencia machos que presentan los tres colores: blanco, negro y carey. Se identificó que estos machos presentaban una aneuploidía, denominada trisomía en el par sexual, de forma que poseían dos cromosomas X y un cromosoma Y. Eran gatos con una dotación genética de 39, XXY (Pedersen *et al.*, 2014).

En el ganado vacuno, más de 20 casos de esta anomalía se diagnosticaron en toros infértiles (Ducos *et al.*, 2008). Y un mosaico 39, XXY/38, XY fue descrito en un jabalí azoospermico reclutado para la inseminación artificial (Pinton *et al.*, 2011). Los autores analizaron la constitución cromosómica en cultivos de linfocitos y fibroblastos derivados de las gónadas. En ambos tejidos, se observó una prevalencia de la línea celular trisómica (aproximadamente 95%). Se sabe que la trisomía XXY en humanos se asocia con un riesgo elevado de malignidad. Tal caso también se identificó en un perro trisómico XXY, que padecía cáncer testicular (Reimann-Berg *et al.*, 2008).

Otras dos aneuploidías comunes del cromosoma sexual (XXX y XYY) se han descrito en caballos, ganado y perros. Los portadores generalmente son infértiles, por ejemplo, una yegua XXX (De Lorenzi *et al.*, 2010) y una perra XXX (O'Connor *et al.*, 2011).

Los antecedentes genéticos de los trastornos del desarrollo sexual (DSD) y la fertilidad alterada (IF) acompañada de un desarrollo sexual normal son cuestiones importantes en la cría de animales. La identificación del gen causante y las mutaciones cromosómicas es especialmente importante en estas especies, en las que la inseminación artificial es una tecnología de reproducción común. En tales especies, una evaluación citogenética de rutina de los toros se lleva a cabo en numerosos países.

Hermafroditismo

La condición intersexual más común, el pseudohermafrodita masculino, tiene tejido testicular en la cavidad abdominal o debajo de la piel en la región escrotal, y órganos genitales externos que se asemejan a los de las hembras. Los gatos persas pueden presentar pseudohermafroditismo cuando se ven afectados por el síndrome paramesonéfrico (Mülleriano) del conducto persistente. Los testículos no descendidos se unen a los cuernos uterinos. Hay oviductos bilaterales, un útero completo con cuello uterino y una porción craneal de la vagina. Pueden estar presentes testículos escrotales bilaterales o criptorquidia unilateral o bilateral. Los animales afectados pueden presentarse clínicamente con piometra, infección del tracto urinario, infección de próstata o tumor de células de Sertoli. El diagnóstico se confirma por la presencia de una constitución cromosómica 78, XY, testículos bilaterales y todos los derivados del conducto paramesonéfrico (mülleriano). La masculinización dependiente de andrógenos es la de un macho normal. El tratamiento se limita a la castración y la histerectomía. El defecto se hereda como un rasgo autosómico recesivo, y tanto las hembras como los machos pueden ser portadores.

Los perros homocigóticos afectados con un testículo descendente son en general fértiles y capaces de transmitir el rasgo a todos los descendientes.

Los pseudohermafroditas masculinos sólo poseen tejido gonadal testicular. Son responsables de la mayoría de los casos de intersexo pues son el resultado o bien de una inhibición incompleta del sistema de conductos de Müller o bien de la masculinización incompleta del sistema de conductos de Wolff, del seno urogenital o de las secreciones testiculares fetales.

Esta anomalía en el desarrollo del sexo se presenta bastante frecuente en cabras, sobretodo se ha observado en las razas sin cuernos (Soller *et al.*, 1969). El gen autosómico dominante para la ausencia de cuernos también es responsable de intersexualidad en hembras e infertilidad en machos. En la hembra homocigótica, el gen provoca estímulo medular y desarrollo del tejido testicular en la gónada indiferenciada, comportándose casi como un cromosoma Y y activando un gen en el X que controla la estimulación medular. El complemento cromosómico suele ser 60, XX. El gen tiene una penetrancia y expresividad variable con respecto al grado de intersexualidad, por lo que el fenómeno varía desde un macho casi normal hasta una hembra casi normal. Se ha visto que los animales con un fenotipo predominantemente masculino tienen una buena libido, testículos escrotales o inguinales, prepucio y pene normales derivados del conducto de Wolff bien desarrollados y derivados del conducto de Müller rudimentarios. Los animales con un fenotipo femenino tienen una distancia ano-genital aumentada, clítoris acrecentado, vagina bien desarrollada, testículos intra-abdominales, útero, ampollas y vesículas seminales pequeñas. El tejido testicular es hipoplásico y los túbulos seminíferos están revestidos por células de Sertoli (Basrur y Kanagawa, 1969).

En tres cabras pseudohermafroditas masculinas con testículos descendidos, vagina y útero, se encontró un complemento cromosómico de 60, XY (Basrur y Kanagawa, 1969) y en otro caso de 60, XX/60, XY (Lojda, 1968).

La intersexualidad es frecuente en cerdos, sobretodo en algunas razas. Los hermafroditas verdaderos parecen ser bastante frecuentes aunque muchos pasan desapercibidos en vida, porque sus genitales externos tienen carácter femenino y sus ovarios cuando existen, suelen ser funcionales. Generalmente el clítoris está hiperatrofiado y en algunos casos, es fálico. La vagina es patente y el útero es desarrollado, la trompa de Falopio termina en saco ciego y hay epidídimo y conductos eferentes. Las gónadas siempre son intra-abdominales.

En perro, los pseudohermafroditas masculinos tienen genitales externos femeninos con un clítoris agrandado y útero, pero normalmente no hay oviductos. Las gónadas tienen tejido testicular y se encuentran en el abdomen o en el canal inguinal. Según Hare y Singh, 1979, cinco animales con esta anomalía que presentaron cromosomas 78, XX, pertenecían a la raza Cocker spaniels.

La importancia de la fertilidad en los animales domésticos y de consumo es algo indiscutible dado que supone el principio de la obtención de una mayor producción. Como se ha visto en el capítulo, una gran mayoría de los trastornos en el desarrollo sexual tienen como inicio la alteración en los cromosomas tanto autosómicos como en el par sexual. De aquí que como parte de una medida preventiva

para problemas de infertilidad, son necesarios los análisis citogenéticos integrando tanto a los laboratorios como a los criadores y a los veterinarios.

Referencias bibliográficas

- Barasc H**, Ferchaud S, Mary N, Cucchi MA, Lucena AN, Letron IR, Calgaro A Bonnet N, Dudez AM, Yerle M, Ducos A, Pinton A. 2014. Cytogenetic analysis of somatic and germinal cells from 38,XX/38,XY phenotypically normal boars. *Theriogenology*. 81:368–372.
- Basrur PK**, Kanagawa H. 1969. Anatomic and cytogenetic studies on 19 hornless goats with sexual disorders. *Ann Génét Sél Anim* 1:349-378.
- Bernstein R**, Koo GC, Wachtel SS. 1980. Abnormality of the X chromosome in human XY female with dysgenic ovaries. *Science* 207:768-769.
- Brace MD**, Peters O, Menzies P, King WA, Nino-Soto MI. 2008. Sex chromosome chimerism and the freemartin syndrome in Rideau Arcott sheep. *Cytogenet Genome Res*. 120: 132–139.
- Bugno M**, Slota E, Kolcielny M. 2007. Karyotype evaluation among young horse populations in Poland. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 149: 227–232.
- Cotinot C**, Gianquinto L, Fellous M. 1991. Le déterminisme du sexe: Son contrôle génétique. En: Thibault C, Levasseur MC. 1991. La Reproduction chez les mammifères et l'homme. Ed. Ellipses. INRA. Paris. Pag. 205-219.
- De Lorenzi L**, Molteni L, Zannotti M, Galli C, Parma P. 2010. X trisomy in a sterile mare. *Equine Vet J*. 42: 469–470.
- Ducos A**, Revay T, Kovacs A, Hidas A, Pinton A, Bonnet-Garnier A, Molteni L, Slota E, Switonski M, Arruga MV, van Haeringen WA, Nicolae I, Chaves R, Guedes-Pinto H, Andersson M, Iannuzzi L. 2008. Cytogenetic screening of livestock populations in Europe: an overview. *Cytogenet Genome Res*. 120: 26–41.
- Gilbert SF**, Sutherland MA. 2000. *Developmental Biology*. 6ª Edition.
- Hare WCD**, Singh EL. 1979. *Citogenética de la Reproducción Animal*. Editorial Acribia. Zaragoza (España).
- Hook EB**. 1977. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet*. 29: 94–97.
- Huang B**, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. 1999. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of *SOX9*. *Am J Med Genet*. 87(4):349-353.
- Juras R**, Raudsepp T, Das PJ, Conant E, Cothran EG. 2010. XX/XY blood lymphocyte chimerism in heterosexual dizygotic twins from an American Bashkir curly horse. Case Report. *J Equine Vet Sci*. 30: 575–580.
- Lojda L**. 1968. Chromosomal pattern of testicular hermaphroditism in pigs and the mode of inheritance of this defect. *Proc 6th Int Cong Anim Reprod A. I. Paris* 2: 901-903.

- Lyon MF.** 1961. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.) *Nature* 190: 372 – 373.
- Meyers-Wallen VN.** 2012. Gonadal and sex differentiation abnormalities of dogs and cats. *Sex Dev.* 6: 46–60.
- O'Connor CL, Schweizer C, Gradil C, Schlafer D, Lopate C, Prociuk U, Meyers-Wallen VN, Casal ML.** 2011. Trisomy-X with estrous cycle anomalies in two female dogs *Theriogenology.* 76: 374–380.
- Otake T, Kuroiwa A.** 2016. Molecular mechanism of male differentiation is conserved in the *SRY*-absent mammal, *Tokudaia osimensis*. *Scientific Reports* 6, article number 32874. Doi:10.1038/srep32874.
- Page DC, Mosher R, Simpson E, Fisher EMC, Mardow G.** 1987. The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell,* 51: 1091-1104.
- Pedersen AS, Berg LC, Almstrup K, Thomsen PD.** 2014. A tortoiseshell male cat: chromosome analysis and histologic examination of the testis. *Cytogenet Genome Res.* 142: 107–111.
- Pinton A, Barasc H, Raymond Letron I, Borededebat M, Mary N, Massip K, Bonnet N, Calgaro A, Dudez AM, Fève K, Riquet J, Yerle M, Ducos A.** 2011. Meiotic studies of a 38,XY/39,XXY mosaic boar. *Cytogenet Genome Res.* 133: 202–208.
- Ponce de León FA, Liu W.** 2012. Bovine X and Y Chromosomes. In *Bovine Genomics* (pp. 75-100). Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/9781118301739.ch7
- Ponz R, Arruga MV.** 2003. Estudio citogenético de un caso de freemartinismo ovino en la raza Rasa Aragonesa. *Soc Española Ovinotecnia y Caprinotecnia. (SEOC):* 53-56. ISBN: 84-95219-57-3.
- Reimann-Berg N, Murua Escobar H, Nolte I, Bullerdiek J.** 2008. Testicular tumor in an XXY dog. *Cancer Genet Cytogenet.* 183: 114–116.
- Romano JE, Raussepp T, Mulon PY, Villadóniga GB.** 2015. Non-mosaic monosomy 59,X in cattle: a case report. *Anim Reprod Sci.* 156: 83–90
- Szatkowska I, Zych S, Udala A, Dybus A, Blaszczyk P, Sysa P, Dabrowski T.** 2004. Freemartinism: three cases in goats. *Acta Vet Brno.* 73: 375–378.
- Szczerbal I, Nizanski W, Dzimira S, Nowacka-Woszuik J, Ochota M, Switonski M.** 2015. X monosomy in a virilized female cat. *Reprod Domest Anim.* 50: 344–348.
- Szczerbal I, Nowacka-Woszuik J, Nizanski W, Salamon S, Ochota M, Dzimira S, Atamaniuk W, Switonski M.** 2014. A case of leucocyte chimerism (78,XX/78,XY) in a dog with a disorder of sexual development. *Reprod Domest Anim.* 49: e31–e34.
- Szczerbal I, Switonski M.** 2016. Chromosome Abnormalities in Domestic Animals as Causes of Disorders of Sex Development or Impaired Fertility, *Insights from Animal Reproduction*, Dr. Rita Payan Carreira (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/62053.



Capítulo IV

ENFOQUE GENÉTICO AL “DÉJÀ VU” DE LAS MALFORMACIONES CONGÉNITAS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

En general, muchas veces cuando se dice que una malformación es congénita se asocia con un problema genético, más aún coloquialmente se utilizan en forma indiscriminada los mismos términos para enfermedades de distinto tipo, diciendo que se trata de una enfermedad congénita o hereditaria o genética. Frente a este concepto erróneo se tratará de clarificar algunos de los términos, ya que congénito (del Lat. *congénitus*) está referido a defectos que se detectan o visualizan en un animal recién nacido pero la causa del mismo puede tener distintos orígenes (Figura 1).



Figura 1: Ternero nacido sin vida con deformidades esqueléticas, paladar hendido, hernia umbilical (etiología desconocida). (Foto cortesía del Dr. Diego Riviezzi, Médico Veterinario, ejercicio liberal Departamento de Florida-Uruguay).

En algunos casos puede ser una causa genética o una causa epigenética. En otros casos pueden existir causas no genéticas (ambientales) y por último están las causas multifactoriales actuando al mismo tiempo en el desarrollo embrionario y fetal.

Dentro de las causas ambientales el espectro es muy amplio, como por ejemplo algunos tipos de virus, parásitos, presencia de herbicidas contaminando aguas, presencia de toxinas en una ración mal conservada, radiaciones (nucleares, U.V, rayos X), exposición a sustancias químicas y fármacos. Dentro de los fármacos con efecto teratogénico en humanos estuvo la tristemente famosa talidomida utilizada en mujeres embarazadas entre el final de 1950 y principio de los años 60, para prevenir efectos digestivos en los primeros meses del embarazo con la consecuencia de miles de nacimientos, en todo el mundo, de niños con acortamiento de miembros (focomelia irreversible).

Cuando se habla de efectos multifactoriales se interrelaciona lo genético y lo ambiental basado en el concepto clásico de que el fenotipo es la manifestación de un genotipo en un ambiente. A este concepto clásico hoy en día se deben agregar los efectos epigenéticos.

En una patología genética, se dice que hay alteraciones que se pueden asociar con alteraciones del genoma, ya sea a nivel de genoma nuclear o del genoma mitocondrial. Este tipo de alteraciones pueden ser hereditarias cuando están alterados los genomas de las células germinales (óvulos, espermatozoides) transmitiéndose de generación en generación.

Hay que recordar que cuando está afectado el genoma mitocondrial la transmisión hereditaria será por vía materna de una generación a la siguiente, ya que las mitocondrias (órganulos vitales para la respiración y energía de las células) solos son aportadas por el óvulo.

Cuando la patología es genética pero no hereditaria afecta a células somáticas de un individuo determinado (Ej. mutación en las células de algún tejido del organismo). Por lo tanto no siempre una patología genética se hereda o se trasmite a la descendencia.

La teratología (del griego *teratos*, “monstruo” y *genos o génesis*, “origen o nacimiento”) es una rama de las ciencias médicas muy apasionante y diversa, que se dedica al estudio de las malformaciones congénitas. Estudia en profundidad malformaciones de organismos animales y vegetales. El término fue introducido en el siglo XIX por Saint Hilaire (1772-1844) en su libro “Histoire générale et particulière des anomalies de l’organisation chez l’homme et les animaux”, (subtitulado como “Traité de tératologie” publicado en 1832).

Esta rama tiene su base más firme en el estudio del desarrollo embriológico de los organismos. A nivel histórico trata de explicar los mecanismos implicados en las malformaciones y en sus comienzos se fundamentó en el concepto lamarkiano de la acción de las causas externas sobre la evolución del embrión. Los conceptos lamarkianos vienen resurgiendo con más fuerza a través de los estudios epigenéticos y de la herencia transgeneracional.

Saint Hilaire, como padre de la teratología, denomina a los llamados “monstruos” con los siguientes términos y expresiones de la época: “la monstruosidad es una anomalía congénita muy grave que dificulta o hace de todo punto imposible el cumplimiento de una o de muchas funciones, dando lugar, en los individuos en que aparece, a un estado de conformación anormal, apreciable al exterior y diferente del que ordinariamente presentan los seres de su especie”.

A principios del siglo pasado Gurit (1929), de la Escuela Veterinaria de Berlín, había clasificado 740 “monstruosidades” en animales domésticos, discriminadas según la especie (239 en bovinos, 179 en ovinos, 87 en suinos, 78 en caninos, 71 en felinos, 56 en equinos, 24 en caprinos y 3 en asnos).

González y García y González Álvarez (“Elementos de teratología del hombre y de los animales domésticos”, 1929, Zaragoza) publicaron un compendio detallado de anomalías congénitas y las clasificaron siguiendo los conceptos de la Escuela Alemana. En esa época realizar trabajos o libros en esta temática, era muy laborioso debido a que las ilustraciones de las malformaciones se dibujaban con tinta logrando una perfección extraordinaria. En el papel se detallaban y se plasmaban las malformaciones observadas.

Se utilizaba una compleja clasificación donde se dividían las malformaciones en anomalías simples, complejas, monstruosidades simples, dobles, triples y se las incluía en tribus y géneros, según el tipo. Por ejemplo, de los monstruos simples se decía que eran elementos de un solo embrión mientras que de los dobles se consideraba que procedían de la unión de elementos de dos individuos. A continuación se exponen algunos ejemplos actualizados.

Diprosopia o Diprosopus

Es una rara malformación que se caracteriza por duplicidad parcial cefálico-facial siendo incompatible con la vida y en general no son viables (Figura 2). Los diprosopus han sido descritos en distintas especies de animales domésticos. En bovinos este tipo de malformación (OMIA 000290-9913) junto con la ciclopía (fosa

orbital única con presencia de un sólo ojo en parte media facial), los craneópagos (duplicación con unión a través del cráneo) y los toracópagos (duplicación con unión a través del tórax), se presentan con una frecuencia que varía entre 5% a 10% (Vale Echeto *et al.*, 2004).

Esta patología se ha visto incrementada en rodeos donde hay una alta tasa de nacimientos de mellizos y en condiciones de endogamia (consanguinidad alta).



Figura 2: Ternera de raza Hereford con diprosopia. (Foto tomada por una de las autoras de un caso ingresado en el Hospital Veterinario de FVET-UdelaR).

Perosomus elumbis

Esta patología ha sido descrita en distintas especies domésticas y en varias razas de bovinos, ovinas, cabras, cerdos, equinos, caninos. En humanos se conoce una patología similar con el nombre de Síndrome de regresión caudal, donde actualmente hay evidencia de genes asociados a la misma.

En bovinos *Perosomus elumbis* (OMIA 000789-9913) es una patología congénita compleja que se presenta con una manifestación fenotípica notoria. El sistema músculo-esquelético se ve afectado principalmente, con agenesia o ausencia de vértebras lumbares, sacras y coxígeas de forma total o parcial, artrogriposis de las patas posteriores (alteraciones músculo-esqueléticas posteriores). A su vez la médula espinal termina en un conducto vertebral en fondo de saco ciego. Estos animales pueden presentar malformaciones a nivel ano-rectal, urogenital y en órganos abdominales. (Figura 3).



Figura 3: Ternera nacida con la malformación Perosomus elumbis. Caso de estudio en FVET-UdelaR por Profesores del Área de Clínica de Ruminantes y Suinos, del Área de Patología y estudiantes de grado (año 2013, FVET-UdelaR). Necropsia realizada por el patólogo. José Pedro Pacheco (Área de Patología-FVET-UdelaR) donde identificó la presencia de una sola vértebra lumbar con morfología anormal, ausencia del resto de vértebras lumbares, sacras y coccígeas, con discontinuidad de médula raquídea.

En la especie bovina, los terneros nacen muertos a término o no sobreviven a la etapa perinatal (defecto de tipo letal). Los animales Perosomus elumbis generan partos dificultosos o distócicos por la rigidez de los miembros posteriores. Para salvar a la madre, generalmente, hay que contar con asistencia al parto por el médico veterinario para la realización de cesárea o fetotomía si el animal se encuentra muerto en el canal de parto.

La causa es desconocida aunque se piensa que puede haber un fuerte componente genético. Dentro de las causas ambientales el virus de la diarrea viral bovina (BVD) podría originar malformaciones similares al Perosomus elumbis.

La primera descripción en bovinos data del año 1832, mientras se evidenció un aumento de casos en bovinos a partir de la década de 1980. Leipold, entre 1986 y 1992, estudiando la raza Holstein identificó 25 casos proponiendo la teoría de una base hereditaria para los Perosomus. Hasta la fecha no se ha podido encontrar una genealogía común, aunque esto no quiere decir que no exista un fuerte componente genético (cambios o mutaciones en uno o varios genes). La hipótesis de mutaciones

en distintos genes hace más compleja la identificación de un ancestro ya que la transmisión puede venir por distintas líneas de reproductores portadores.

Dentro de la clasificación actual de patologías congénitas con múltiples malformaciones hay autores que la consideran dentro de las “complejas” o sea un conjunto de defectos morfológicos de los que no se conoce la causa ni el mecanismo de acción, pero que a nivel del desarrollo se comparte una región embriológica.

El foco actual de estudio se centra en analizar mutaciones en genes del desarrollo. Dentro de ellos, la familia de genes homeobox (*Hox*) juega un papel muy importante en el desarrollo del patrón craneocaudal, así como la transcripción anómala de factores que actúan sobre genes del desarrollo.

Para un correcto diagnóstico de un *Perosomus elumbis* en cualquier especie de animales domésticos, es necesaria la realización de una descripción completa de la anatomía patológica y la utilización de técnicas de imagenología (Ej. Rayos X). Si bien a nivel mundial el número de casos es bajo y con poco impacto económico, hay que estar atentos ya que la raza lechera Holstein es una de las más afectadas, y se podría estar ante una enfermedad genética emergente como lo fueron a nivel mundial el síndrome Complejo Vertebral de Malformación (CVM) y la braquiespina.

Continuando con las antiguas clasificaciones de las malformaciones congénitas y retomando la Escuela de Berlín que divide a las anomalías como simples (determinados gigantismos o enanismos), y complejas (que incluye hermafroditismos y heterotáxias). Las heterotáxias son alteraciones del lugar que ocupan los órganos, como las inversiones viscerales, por ejemplo el hígado en el lado izquierdo. En esta clasificación se denominaba monstruo melomeliano (melo: miembro) a aquel animal que además de los miembros locomotores normales presenta otros miembros anejos adheridos al cuerpo. En esta clasificación de finales del siglo XIX estaba la denominada “tribu parásito” con los monstruos doble parásito o monstruos polimelianos. Este tipo de malformación fue descrita por primera vez en animales en el año 1642, por Aldrovandus y es conocida en distintas especies (González y García y González Álvarez, 1929). La malformación denominada “parásito” va a estar representado en el organismo por uno o varios miembros que estarán fijados en diversas regiones del “ser principal”. De aquí surge el llamado género notomelo donde la porción “parasitaria” en general es uno o más miembros accesorios no funcionales que se fijan al dorso del “ser principal”. Actualmente se describe como polimelia (presencia de extremidades supernumerarias) y ha sido descrita en distintas especies de mamíferos y aves. Si bien la causa es desconocida, se piensa que hay múltiples factores involucrados y que puede ocurrir por una dispersión anómala de células germinales embrionarias. En bovinos se estima una frecuencia de aparición

entre un 2 a 3.5%. Según la disposición de los miembros ectópicos se clasifican en **notomelia** a nivel de la columna vertebral como se observa en la Figura 4; **pigomelia** a nivel de la pelvis, **toracomelia** a nivel de torax, **cefalomelia** a nivel craneal.



Figura 4: Ternera Holstein con notomelia. Se observa que la extremidad supernumeraria dorsal presenta dedo fusionado (sindactilia). (Caso clínico. Cortesía Dr. Carlos Morón FVET-UdelaR, año 2016).

Se habla de notomelia cuando la disposición del miembro ectópico se encuentra en el eje del notocordio o cuerda dorsal embrionaria (esqueleto axial embrionario).

Denholm *et al.*, (2014) mediante estudios del genoma completo del bovino en la raza Aberdeen Angus, determinaron una asociación entre el fenotipo “duplicaciones del desarrollo, DD”, (OMIA 001226-9913) y mutaciones en el gen *NHLRC2* (cromosoma BTA26). En el mercado hay disponibles test de diagnóstico molecular

para identificar bovinos portadores de esta malformación (Laboratorio de Genética Animal de la Universidad de Queensland y en la empresa privada Neogen Corporation, GeneSeek, Lincoln, Nebraska).

Neupane *et al.*, (2017) mediante GWAS identifican en la raza Holstein Friesian, regiones candidatas en los cromosomas BTA10 y BTA13 asociadas al fenotipo “polimelia”. Ellos proponen que esta malformación es genéticamente distinta iferente en ésta raza en que éste trastorno en Friesians es genéticamente diferente a las Duplicaciones del Desarrollo observadas en la raza Aberdeen Angus.

Ha pasado mucha agua bajo el puente desde las antiguas clasificaciones del siglo XIX de las malformaciones del desarrollo en animales. En la actualidad se realiza un estudio multidisciplinario con técnicas avanzadas de biología molecular.

Rojas Leonart (2010 y 2016) propone la utilización de una nomenclatura más amigable y acorde a la época, además de ciertos protocolos y consejos para poder diagnosticar y comunicar. Este autor hace énfasis en que muchos casos de fetos malformados se reabsorben a nivel uterino, otros llegan a término pero nacen muertos o mueren en los primeros días de vida, por no ser viables. Propone reglas básicas de ayuda a criadores, veterinarios de ejercicio liberal en el campo. En la figura 5 se transmiten esta reglas de manera didáctica, a modo de escalera de conocimiento y observación de seis peldaños.

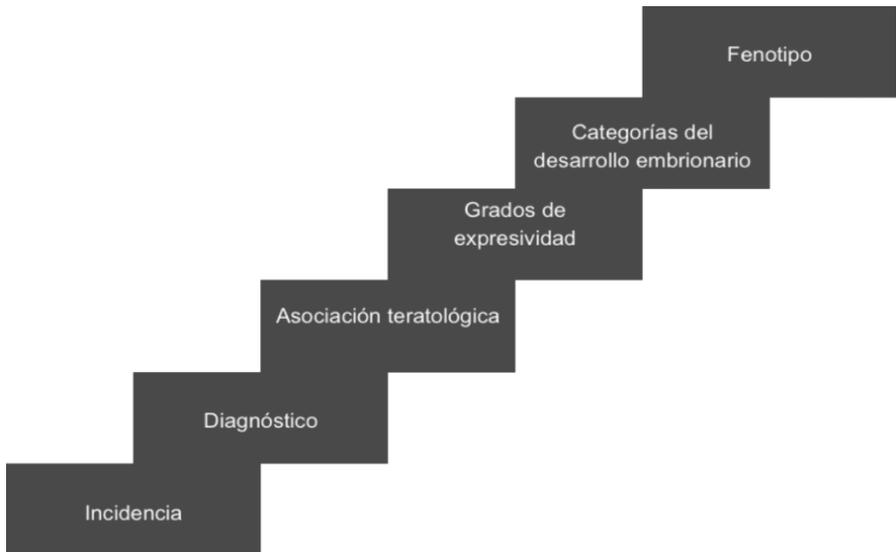


Figura 5: La escalera de los 6 peldaños como guía básica para el estudio de malformaciones en animales (basado en Rojas Leonart, 2010 y 2016).

Siguiendo la figura 5, en el **primer peldaño** se trata de analizar y describir lo que se ve o se observa, es decir la manifestación del fenotipo del animal. En este primer peldaño se aplica el concepto de variación continua, por haber individuos “normales” (individuos parecidos entre sí de acuerdo a su especie o raza), individuos “levemente anómalos”, y por último, individuos “enormemente anómalos”.

Si bien las malformaciones en animales son muy variables e increíbles, puede haber algunas más comunes que se denominan “clásicas” como el braquignatismo.

Utilizando la selección artificial en algunas razas caninas, como el Bull Dog Inglés, ha prevalecido el desarrollo de la mandíbula inferior que se proyecta levemente hacia delante de la superior generando una mordida en tijera que forma parte del estándar racial. En algunos casos las malformaciones pueden llegar a ser muy extrañas y raras formando parte de un grupo denominado “rarezas teratológicas”, muy poco frecuentes o únicas como por ejemplo en bovinos, la aparición de un tercer testículo desplazado.

El **segundo peldaño**, de acuerdo con la clasificación de Arey (1974), trata las distintas categorías que se pueden encontrar durante el desarrollo embrionario y fetal. Éstas se refieren: a) ausencia de desarrollo total (agenesia); b) desarrollo parcial, incompleto o de migración de un órgano (ej. fisura palatina, tabicación incompleta del corazón, criptorquidea, etc.); c) permanencia de supervivencias embrionarias (ej. persistencia de membrana anal); d) desplazamientos (ej. Notomelia según la clasificación moderna) y e) diferenciación atípica (ej. tumores congénitos como blastomas y teratomas).

En este peldaño se introduce como causas posibles la acción de agentes teratógenos actuando sobre el desarrollo embrionario (ej. sustancias tóxicas como determinados agroquímicos, fármacos, algún tipo de agente infeccioso, etc.). Sin embargo se debería incluir en este peldaño el llamado “ambiente epigenético” o sea la interacción entre el epigenoma y el medio ambiente que regulan potencialmente la actividad de los genes. Existe un número creciente de publicaciones que tratan de profundizar en el estudio de este diálogo (impacto del medio ambiente + epigenoma), ya que el impacto es directo en el momento de la fecundación y durante el desarrollo embrionario y fetal. Hay que recordar que en la etapa de fecundación y en las primeras etapas del desarrollo embrionario, se producen fenómenos de reprogramación epigenética y se establece el nuevo perfil epigenético para la próxima descendencia (metilaciones de ADN y modificaciones de las proteínas histonas).

Dentro de las sustancias tóxicas hay investigaciones de los efectos teratogénicos graves producidos por el herbicida glifosato (N fosfometilglicina, PMG). Esta sustancia se utiliza para el control de malezas y está asociada a los paquetes agrotec-

nológicos en campos sembrados con especies OMG (organismos modificados genéticamente) como el trigo, soja, maíz, algodón, alfalfa, etc. Un tema no menor a tener en cuenta es la resistencia que las malezas están teniendo antes estos potentes herbicidas generando un aumento en la dosis a utilizar de los mismos. El herbicida llegaría a los animales a través de la alimentación o por aspersión con la consecuencia final de aumento de efectos teratogénicos. Por ejemplo, en cerdos se vio el nacimiento de lechones con malformaciones graves tales como atrofia de espina dorsal, atroñas de orejas, deformaciones craneales graves, hembra con presencia de testículo, ciclopía (presencia de un solo ojo en posición central), ausencia de piernas, ausencia de tronco y vísceras internas sin conexión (intestino anterior y posterior no conectados) (Krüger *et al.*, 2014).

El **tercer peldaño** de la escalera se refiere a la expresividad de la malformación ya que pueden existir distintos grados de severidad en un mismo tipo de alteración. Este grado de expresión puede ser debido a varias causas entre las que se encuentran la combinación genética que recibió el individuo mal formado, la etapa en la que actuó un determinado agente teratogénico o el ambiente uterino entre otras.

El **cuarto peldaño** (asociaciones teratológicas) está relacionado con el “síndrome teratológico”, cuando aparecen dos, tres o más tipos de malformaciones en un mismo animal que suelen presentarse juntas o asociadas. En el síndrome existe un patrón de malformaciones que se repiten de la misma forma y simultáneamente en los individuos afectados. Un ejemplo clásico en bovinos es la presencia de artrogriposis asociada a paladar hendido.

El **quinto peldaño** conduce al diagnóstico y hoy en día se debe realizar un abordaje holístico para llegar a poder identificar la o las causas de las anomalías congénitas. En general se habla de causas en plural puesto que la mayoría de las veces son muchos los factores que intervienen como causantes de la malformación (causas multifactoriales). El abordaje debe hacerse con todos los recursos disponibles para llegar al fondo de la comprensión del problema. Es necesaria la realización de una descripción completa del caso clínico, seguir un estricto protocolo de anatomía patológica (descripción externa, necropsia), histopatología y apoyo de técnicas de imagenología como RX; ecografías, tomografías, etc. También es necesario realizar un correcto diferencial de las causas ambientales (plantas tóxicas, serología para descartar presencia de virus con potencial teratogénico, desbalances de metabolitos, etc.), así como un diferencial con otras patologías congénitas de causa hereditaria conocida. Como abordaje de estudios genéticos no hay que olvidar los estudios cromosómicos con citogenética de alta resolución. En la literatura hay publicaciones de casos de malformaciones que responden a alteraciones de cromosomas de tipo

autosómico, como la braquignatia letal del bovino asociada a una trisomía del cromosoma 17.

En cuanto a las nuevas técnicas de diagnóstico genético por ADN se puede decir que ésta, es la era del **diagnóstico genético “a la carta”**. Los avances en la secuenciación masiva de los genomas animales permiten conocer y profundizar el estudio de las enfermedades hereditarias de los animales domésticos relacionadas con cambios o mutaciones en la molécula de ADN. Estos cambios pueden ser a nivel del ADN que se encuentra en el núcleo de las células o en el ADN mitocondrial. Los cambios en la molécula de ADN pueden ser de varios tipos: cambio de un solo nucleótido denominados SNP en la molécula de ADN, inserciones o deleciones de varios nucleótidos, duplicaciones de nucleótidos, reordenaciones complejas, cambios en sitios de regulación de los genes, número de copias repetidas (CNV) etc. La diferencia entre un animal “normal” y uno con una “malformación” puede estar dada por un solo cambio de nucleótido (SNP) dependiendo del lugar en el gen y el papel que cumpla ese cambio.

Dentro de las principales técnicas moleculares de diagnóstico se encuentra el desarrollo de los distintos tipos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) como la PCR a tiempo final, PCR a tiempo real, PCR cuantitativa, PCR digital, etc. Por otro lado ha habido un gran avance en el desarrollo de plataformas de análisis genómico (microchip de ADN, Chips de SNP donde se identifican miles de polimorfismos o mutaciones de una sola base del ADN, secuenciación masiva de los genomas, etc.). Dependiendo de los recursos económicos y de la tecnología que cada laboratorio pueda acceder será el método de diagnóstico que se podrá utilizar para detectar los animales portadores. La importancia de un buen diagnóstico del veterinario clínico, ya sea de pequeños animales o de animales de producción, es vital para impedir la diseminación de este tipo de patologías. De igual forma es necesaria una estrecha colaboración e interrelación entre la Academia, Organismos Gubernamentales (Ministerios de Ganadería y Agricultura) y organismos privados vinculados a la salud animal.

Quizas un poco más cansados se llega al **Sexto peldaño** de la escalera donde se encuentra la dificultad de establecer la frecuencia o incidencia de aparición de determinada malformación.

Esto puede ser debido a temas culturales, donde los criadores muchas veces no quieren proporcionar esa información por miedo a la descalificación de sus rodeos, majadas, hatos o planteles de reproductores. En general, si bien se estima a modo global incidencias entre 0.5 a 1.5% de malformaciones en animales domésticos, esta cifra dependerá de lo cerrado que sea una rodeo o explotación, del uso

excesivo de determinados reproductores portadores, de los sistemas de cría utilizados, sin dejar de olvidar la presencia de agentes teratogénicos que puedan estar afectando a una determinada región geográfica. Basta recordar los efectos devastadores de las guerras químicas, nucleares y de los escapes de energía altamente radiactiva por accidentes en plantas nucleares.

Para Arey (1972) podría existir un **séptimo peldaño** que es el atavismo (latín “atavus” que significa “antepasado”). Se podría decir que es como un “salto al pasado” ya que se refiere a la aparición de una característica de un antecesor lejano en la evolución de esa especie. A nivel genético se explicaría como la expresión de genes ancestrales. Un ejemplo de un carácter atávico en cerdos es la presencia de mamellas o mamelas (Dos apéndices carnosos que aparecen en la base del cuello) (Figura 6), otro ejemplo sería la existencia de polidactilia en los caballos.



Figura 6: Observación de mamellas en cerdos (Cerdos mamelados de Uruguay). Fotos de una de las autoras y cortesía del Dr. Gustavo Castro y Doc. Beatriz Mernies (FVET-UdelaR).

Los mismos “monstruos” de siempre siguen resurgiendo y esto puede ser debido a la presión de selección y prácticas de consanguinidad que ejerce el hombre sobre las especies domésticas productivas o de compañía. También se debe tener en cuenta la aparición de virus emergentes que producen malformaciones congénitas en ovinos y bovinos, como el virus de Schmallenberg detectado por primera vez en el 2011 en Alemania. No hay que olvidar el uso indiscriminado, en los últimos años de agrotóxicos asociados a los cultivos transgénicos y que representan una alerta sobre el potencial teratogénico para el hombre y los animales.

Por eso se dice que en el tema de las malformaciones congénitas se estaría viendo “la punta del iceberg” ya que a nivel de productores, veterinarios de campo

o de industria solo se comunica lo que se ve, o sea posibles casos de abortos tardíos malformados o animales a término no viables y se estaría perdiendo un número significativo de casos sin diagnosticar durante la preñez.

Para desarrollar un estudio sistematizado de estas patologías y poder también profundizar en el estudio de posibles nuevas mutaciones es necesario contar con los llamados “biobancos”. Los “biobancos” de recursos genómicos son colecciones sistematizadas de biomateriales que se almacenan en forma ordenada, organizada con una logística y de manera segura siguiendo normas de control de calidad.

Estos biomateriales deben ir acompañados de información fenotípica y debidamente identificados para ser útiles en investigación y diagnóstico aplicado a la medicina veterinaria (contar con controles positivos y negativos debidamente estandarizados). Dentro de los “biobancos” de recursos genómicos además de los “criobancos” de germoplasma se encuentran los llamados “criobancos” de ADN, “criobancos” de células y tejidos, “criobancos” de suero, etc.

Para la generación de cualquiera de estos tipos de “biobancos” se deben diseñar protocolos para la colección, implementación y archivo de biomaterial. En la extracción de ácidos nucleicos, se deberá tener en cuenta los distintos tipos de muestras biológicas así como la evaluación y la optimización de la calidad/cantidad (rendimiento, pureza y funcionalidad) de los productos a obtener.

Como se ve, la Teratología del siglo XXI necesita de un enfoque holístico donde los avances en el estudio del genoma y del epigenoma complementan y profundizan el conocimiento de las malformaciones. Es por eso que los veterinarios junto a los productores y criadores deben ser centinelas agudos para identificar, dar la voz de alerta y remitir el material biológico para contribuir a detectar posibles enfermedades genéticas emergentes y llegar a tiempo para identificar los reproductores portadores.

Recursos “on line” para profundizar en el estudio de casos de teratología veterinaria

En varios de los ejemplos que se explicaron en este capítulo se utilizaba la sigla **OMIA** (Online Mendelian Inheritance in Animals <http://omia.angis.org.au/home/>) .que responde a la base más completa sobre patología y enfermedades con base genética en animales. Una sección de este libro se dedica a profundizar en los alcances de la misma.

Página web del Centro de Educación Veterinaria de la Universidad de Sydney-Australia que profundiza en el estudio de casos clínicos de malformaciones congénitas con excelente material. En este link se encuentra el VetBook (recurso veterinario muy completo de libre acceso “*on line*”) donde buscando por especie se encuentra de forma ilustrada, las distintas patologías con base genética y no genética, en especies de interés productivo y en animales de compañía.

(link: http://vetbook.org/wiki/cow/index.php/Genetic_diseases_of_cows)

Portal de la Universidad Complutense de Madrid en el que se encuentra un museo de veterinaria con más de 3000 piezas anatómicas (link: <http://webs.ucm.es/info/museoveterinariocomplutense/fondos.php?idiomas=en>)

Portal de la Universidad de Wyoming- Estados Unidos (link: http://www.uwyo.edu/vetsci/undergraduates/courses/patb_4110/2009_lectures/31_genetic_disease/html/class_notes.htm) .

Quien vaya de visita a París puede ver en el museo Dupuytren una colección de malformaciones en humanos con más de 6000 piezas anatómicas. Estas piezas pertenecían a una colección personal del Doctor Dupuytren, pensada para la investigación y datan de principios de siglo XIX. (link: http://www.upmc.fr/fr/culture/patrimoine/patrimoine_scientifique/musee_dupuytren.html)

Portal del Museo Vrolik (Ámsterdam, Holanda) fundado en 1869 por Gerardus Vrolink y su hijo Willerm Vrolik, cuenta con unas 5000 piezas de animales y humanos con defectos congénitos (link: <https://www.amc.nl/web/AMC-website/Museum-Vrolik-NL/Museum-Vrolik.htm>).

Referencias bibliográficas

- Agerholm J. et al.**, 2014. Perosomus elumbis in Danish Holstein cattle. BMC Veterinary Research 10:227 <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/227>.
- Agerholm J.** 2007. Inherited Disorders in Danish Cattle APMIS. Suppl. 122: Vol. 115.
- Arey LB.** 1974. Developmental Anatomy (a Textbook and Laboratory Manual of Embryology). Revised Seventh Edition. Philadelphia, PA: WB Saunders Co.
- Beever JE. et al.**, 2014. Developmental Duplications (DD):. Elucidation of the underlying molecular genetic basis of polymelia phenotypes in Angus cattle. Proc. XXVIII World Buiatrics Congress, Cairns Australia. Abstract 0106.
- Denholm LJ, Martin L, Teseling CF, Parnell PF, Beever JE.** 2014. Developmental Duplications (DD): 2. Mutation of the NHLRC2 gene causes neural tube defects in Angus cattle with multiple congenital malformation phenotypes that include axial and limb duplications, heteropagus conjoined twins, midbrain and forebrain malformations including pseudoholoprosencephalon, craniofacial dysmorphogenesis, microphthal-

- mia, diprosopus, embryogenic teratomas, dermoid cysts, myolipomas, split cord malformation and cranial and spinal dysraphism. Proc. XXVIII World Buiatrics Congress, Cairns Australia: Abstract 0100.
- Dutra F.** 2016. Monstruosidades y enfermedades genéticas de los bovinos en Uruguay. Su importancia y significado. Conference: XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. At <http://centromedicoveterinariopaysandu.com>, Volume: 44: 41-47
- Gentile A, Testoni S.** 2006. Inherited disorders of cattle.: a selected review. Res. 43 (1): 17-29.
- Giovambattista G, Peral García P.** 2010. Genética de animales domésticos. Capítulo 8. Kienast, M. Enfermedades de origen genético en animales domésticos. Edit. Inter-médica. 1ª ed. ISBN: 978-950-555-378-5.
- González y García J, González Alvarez R.** 1929. Elementos de teratología del hombre de hoy y de los animales domésticos. Tip. La Académica. Galo Ponte 3 y 5. Zaragoza. España (24-118).
- Kelly L, Dutra F, Trenchi G, Llambí S, Rivero R, Moraes J, D'Agosto S, Peraza P, Ravagnolo O, DallaRizza M.** 2012. Diagnóstico molecular de enfermedades bovinas hereditarias presentes en el Uruguay. Veterinaria (Montevideo) 48(188) 3-11.
- Krüger M, Schrödl W, Pedersen Ib, Shehata AA.** 2014. Detection of Glyphosate in Malformed Piglets. J Environ Anal Toxicol 4: 230. doi: 10.4172/2161-0525.1000230
- Llambí S.** 2015. Patologías congénitas en bovinos. Rev. Opción Veterinaria, N°2, 42-47. <http://www.opcionveterinaria.com.uy/interactiva/2015/082015/#p=1>
- Llambí S.** 2015. Avances en el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias de animales domésticos. Rev. Opción Veterinaria, N°1, 10-15. <http://www.opcionveterinaria.com.uy/interactiva/2015/032015/#p=1>
- Neupane M, et al.,** 2017. Case Study: Polymelia in a Holstein calf Professional Animal Scientist, DOI: 10.15232/pas.2016-01594.
- Orfao de Matos A, Pinto Labajo, R.** 2012. Guía de protocolos utilizados para la obtención de ácidos nucleicos en biobancos. Documentos de la Red de Biobancos. <http://www.redbiobancos.es>. Pag. 1:24.
- Ossa P, Giraldo J, Lopez G, Dias L, Rivera F.** 2012. Colecciones biológicas: una alternativa para los estudios de diversidad. Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. 16 (1): 143 – 155.
- Rojas Leonart I.** 2016. Rarezas Teratológicas en animales: exposición de casos. RED-VET Rev. Electrón. vet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> 2016 Volumen 17 N° 5 - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050516.html>
- Rojas Leonart I.** 2010. Malformaciones congénitas: consideraciones sobre su presentación fenotípica REDVET Rev. electrón. vet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> -<http://revista.veterinaria.org> Vol. 11, N° 04, Abril/2010– <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040410.html>
- Romero A, Artigas R, Llambí S.** 2014. Estatus de enfermedades hereditarias en semen importado de la raza Holando disponible en Uruguay utilizando bases de datos

“*on line*” de dominio público. V Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción Animal (AUPA).

- Romero Velázquez A, et al.** 2015. Identificación de la mutación A/G en el exón/intrón 37 del gen LRP4 asociada a sindactilia en un ternero Aberdeen Angus en Uruguay (primer reporte). Cong. Argentino Genética. Rev. BAG.
- Son Jung M, et al.** 2008. A Case of Perosomus Elumbis in a Holstein Calf. J. Vet. Med. Sci. 70(5): 521–523.
- Tammy L, et al.** 2014. Unilateral notomelia in a newborn Holstein calf. Can. Vet. J. 55: 659–662.
- Vale Echeto L, et al.** 2004. Partial Cephalic and Face Duplicity (Diprosopia) in Bovine: A Clinical and Pathologic Study of one Case. Revista Científica, FCV-LUZ. Vol. XIV, N° 4, 338 – 343.
- Whitlock BK et al.** 2008. Heritable bovine fetal abnormalities. Theriogenology. 70: 535–549.



Capítulo V

UNA MIRADA A LA GENÉTICA DE LA DOMESTICACIÓN ANIMAL

La genética de la domesticación en animales es la entrada a un laberinto complejo que trata de explicar cómo influyen determinados genes para generar diferencias entre especies domesticadas con respecto a sus ancestros silvestres.

El por qué de que todas las especies no pueden ser domesticadas parece tener un fuerte componente genético. La etimología de la palabra “domesticar” viene del latín “*domus*” que significa casa. Según Casas *et al.*, (2016) podría significar “llevar a la casa”, “llevar lo silvestre al hogar” o “domar”. Esto estaría implicando un proceso de “humanización” donde se incorporan otras especies a la vida cotidiana de los seres humanos. Uno de los hitos importantes en la historia de la humanidad fue la llamada “revolución neolítica” hace aproximadamente 9000 a.C (Vere Gordon Childe, 1941) donde el hombre pasa de la etapa de ser nómada a ser sedentario y cambia su forma de sustento. El hombre pasa de tener un sustento netamente basado en la recolección, la caza y la pesca para comenzar una etapa productora (surrimiento de la agricultura con domesticación de plantas y animales). La domesticación se considera un proceso continuo en constante evolución y se podría definir cuando una determinada especie (animal o vegetal) modifica, adquiere, pierde o potencia determinadas características (conformación, fisiológicas, conductuales o comportamentales) y estas a su vez se heredan a futuras generaciones (tabla 1). Algunos de estos cambios están relacionados con diferencias en la concentración de determinadas hormonas (adrenocorticoides) y neurotransmisores.

Fenotipo	Animales
Ciclo estral más frecuente	Perro, gato, cabra.
Comportamiento juvenil o neotenia	Perro
Zonas depigmentadas (parches blancos y marrones)	Perro, caballo, gato, oveja, vaca, cabra, conejo, cerdo
Menor tamaño craneal y cerebral	Perro, gato, burro, caballo, cerdo, oveja, vaca, cabra
Dientes más pequeños	Perro, cerdo
Docilidad	Todas las especies domésticas
Hocico más corto	Perro, gato, cerdo, oveja, vaca, cabra
Orejas caídas	Perro, conejo, cerdo, oveja, cabra, vaca
Orejas pequeñas	Perro, gato

Tabla 1: Principales fenotipos que se consideran afectados por el “síndrome de domesticación” (basado en Wilkins *et al.*, 2014).

El hombre con el paso de los años practicará una selección artificial y de esta manera irá manipulando la diversidad fenotípica con la finalidad de lograr una mayor interacción con otras especies. De igual manera la selección natural adaptativa contribuyó a una mejor convivencia entre el hombre y los animales domésticos. Price, (1984), profundiza sobre el tema de la domesticación y propone que se trata de un proceso que implica la adaptación de una población de animales al hombre y a una vida en cautiverio. En este proceso van a ocurrir una serie de cambios que tienen una base genética con adaptaciones al medio ambiente. La domesticación sería un proceso gradual donde se van fijando caracteres con una base genética. Se estima que una de las primeras especies animales en ser domesticada fue el perro hace más de 15.000 años aunque existe una gran controversia cronológica. Los adelantos utilizando marcadores moleculares de ADN (nuclear y mitocondrial) permitieron identificar grandes eventos y centros de domesticación para esta especie (este y sudeste Asiático, en América del Sur, cordillera andina, África del norte y Europa) y datarían entre 8.000 a 12.000 años.

Charles Darwin, en 1868, escribió el libro “La variación de plantas y animales bajo domesticación” basándose en observaciones aportadas por criadores. Pudo observar y comparar un conjunto de diferencias que existían entre especies domésticas con respecto a sus antepasados en estado salvaje. Este conjunto se conoce hoy en día como “síndrome de la domesticación” y sigue siendo para los genéticos un gran misterio a revelar. Según Darwin las diferencias podrían deberse a unas mejores

condiciones de vida a la que estaban sometidos los animales una vez domesticados. Belyaev, en 1979, da una explicación a este fenómeno asociándolo a niveles de estrés más reducidos por un ambiente más “amigable” y protegido por el hombre. Estos menores niveles de estrés modificarían las respuestas hormonales estableciendo nuevos patrones de expresión de los genes que las codifican. Actualmente se piensa en patrones epigenéticos que se van fijando con el tiempo y heredando a las futuras generaciones en el proceso de domesticación. Nuevas teorías se enfocan hacia un proceso de regulación mediado por epimutaciones muy estables o mutaciones en el ADN que se transmiten por línea germinal.

En el genoma del perro doméstico cuando se lo compara con su antecesor, el lobo gris, se detectan cambios fenotípicos relacionados con genes específicos. Un ejemplo son las variantes alélicas de genes asociados en la respuesta a la lucha o huida. Estas respuestas han tenido una fuerte selección artificial, dando lugar a diferencias de comportamiento entre el perro y el lobo. Janowitz *et al.*, (2016) encontraron alteraciones del epigenoma cuando analizaron metilaciones de la citosinas en estas especies. Estos autores identificaron regiones con alteración de la metilación en genes funcionales vinculados con la codificación de neurotransmisores

Wilkins *et al.*, 2014, proponen una nueva hipótesis sobre el “síndrome de la domesticación” al observar que la ruta biológica o factor común tiene los caracteres fenotípicos que se han modificado. Observan que durante la etapa de desarrollo embrionario todos estos caracteres están relacionados con células provenientes de la cresta neural que tienen la capacidad de migrar y ser pluripotentes.

Estas células son específicas de los vertebrados apareciendo en la embriogénesis temprana en el borde o cresta dorsal del tubo neural para posteriormente ir migrando hacia la región craneal y el tronco. Son células madre precursoras de diversos tipos celulares, tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario como huesos cráneo-faciales, neuronas de ganglios simpáticos, glándulas suprarrenales, médula espinal, melanoblastos, odontoblastos, condrocitos, estroma del iris, epitelio anterior de la córnea entre otros.

Existen varios genes que se encuentran activos en las células de la cresta neural y muchos de ellos participan interactuando entre sí. Por ejemplo hay factores de transcripción activos como: *Sox10*, *Sox9*, *Sox2*, *Mitf*, *FoxD3*, *Pax3*. Genes que codifican para proteínas remodeladoras de la cromatina dependientes de ATP como *Chd7*. Los genes *Kit* y *Ret* que codifican para receptores de una proteína tirosina quinasa. Los genes *Piebald* (s y l) que codifican para la proteína endothelin-3 y para el receptor de endothelin B respectivamente.

Dentro de las características fenotípicas más estudiadas desde el punto de vista genético se encuentra la coloración de las capas de las especies domésticas. Se sabe que existe una amplia variabilidad alélica en los genes que gobiernan la coloración de las capas y que éstas a su vez han sufrido una fuerte presión selectiva por parte del hombre.

Uno de los cambios más llamativos durante el proceso de domesticación son los relacionados con la pigmentación cuando se compara con las especies ancestrales silvestres. En las regiones de la piel cuando aparece el color blanco es producto de carencia de melanocitos que son células que derivan a nivel embrionario de la cresta neural y encargadas de producir pigmento. En casi todas las especies domésticas se observan manchas o parches despigmentados que estarían relacionados con un retraso en la migración de los melanocitos que derivan de las células de la cresta neural.

Se conocen unos 150 genes con, al menos, 300 variantes alélicas asociadas a la distribución y coloración de las capas. Muchos de estos genes actúan en las vías metabólicas de producción y distribución de dos pigmentos: eumelanina (negro/marrón) y feomelanina (rojo). Los mecanismos de herencia de estos genes son complejos puestos que actúan efectos pleiotrópicos y epistáticos.

Hay que tener en cuenta que la mayoría de las llamadas razas modernas se formaron durante los últimos dos o tres siglos y los estándares propuestos por los criadores marcaron una cría selectiva y, en general, con aumento de homocigosidad racial. Uno de las características más afectada en estos estándares raciales fue la coloración del pelaje. Por ejemplo, en muchas razas se fijó un determinado color de pelaje y hasta en la denominación de la misma se incluye el color de la raza (tabla 2).

Raza	Especie	Color
White West Highland Terrier	<i>Canis lupus familiaris</i>	Blanco
Golden Retriever	<i>Canis lupus familiaris</i>	Dorado
Black and tan coonhound	<i>Canis lupus familiaris</i>	Negro y fuego
Large White	<i>Sus scrofa</i>	Blanco
Large black	<i>Sus scrofa</i>	Negro
Chester White	<i>Sus scrofa</i>	Blanco
Brown Swiss	<i>Bos Taurus taurus</i>	Marrón
Red Angus	<i>Bos Taurus taurus</i>	Colorado
White shorthaired goat	<i>Capra hircus</i>	Blanco
Bluefaced Leicester	<i>Ovis aries</i>	Cabeza con pelos blancos sobre piel pigmentada
Red Engadine	<i>Ovis aries</i>	Rojo/marrón

Raza	Especie	Color
American Paint Horse	<i>Equus ferus caballus</i>	Manchados
Azul Ruso	<i>Felis catus</i>	Azul/gris uniforme
Havana Brown	<i>Felis catus</i>	Marrón
White Leghorn	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Plumaje blanco

Tabla 2: Nombres de algunas razas de animales domésticos donde se incluye la identificación del color o característica relacionada con el color.

Hay evidencia científica de que el ser humano seleccionó determinados pelajes de animales en función del uso que le daba a sus pieles como abrigo y por ese motivo el color fue uno de los fenotipos objetivo. En otros casos, es un tema de gusto por la apariencia de una raza. Por ejemplo, en la raza de perros Cimarrón Uruguayo (FCI, Grupo 2, N° 353, 2017) hay una predilección por la capa atigrada (92%) frente a la capa baya leonina (8%). En otros casos, se seleccionó un determinado color de pelaje hasta constituir una raza uniforme como los White West Highland Terrier que por su uso en cinegética para caza menor, se les puede distinguir bien de sus presas (conejos, pequeños roedores, zorros, etc.).

En la raza de bovinos Fleckvieh se identificó una mutación con presencia de pelaje dominante blanco y sordera bilateral. Los estudios del genoma completo (GWAS) con chips de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP 770K), permitieron localizar una región génica en el cromosoma 22 (BTA22) donde se encuentra el gen *MITF* (factor de transcripción asociado a la melanogénesis).

En equinos los patrones de presencia de manchas blancas presentan una gran varianza fenotípica desde el “blanco sólido” pasando por el “salpicado blanco” hasta la sola presencia de pequeñas manchas o marcas despigmentadas. Existe una estrecha asociación entre determinadas zonas de pelaje blanco (máscara blanca abarcando la zona de los ojos), iris de color azul y sordera hereditaria en la raza de caballos American Paint Horse (línea genética del semental “Gunner”) (Pardie *et al.*, 2017) (figura 1).



Figura 1: Potrillo que presenta coloración de pelaje (mancha blanca que abarca zona ocular), iris azul y alteración en la audición. (Foto cortesía: Br. en Veterinaria Mateo Pardié, 2017).

En nexo común serían alteraciones en la migración de los melanocitos. A nivel molecular hay evidencia de distintos tipos de mutaciones en los genes *MITF* y *PAX3* asociadas a variantes alélicas de los genes *KIT* y *EDNRB*.

En otras especies se relaciona con el llamado síndrome de Waardenburg (Oftalmólogo Petrus Waardenburg, 1948) descrita en humanos, gatos, perros, visones, hurones. El modo de herencia es autosómico dominante con expresividad variable. El síndrome se caracteriza por distopia cantorum (distancia aumentada entre los ojos), hipoacusia neurosensorial, zonas de despigmentación en piel y pelo (presencia de canas a edad temprana o presencia de mechón blanco de pelo denominado poliosis), alteraciones en la pigmentación del iris con presencia de heterocromía completa (un ojo azul y otro marrón) o parcial. En humanos se clasifica este síndrome en distintos grados de acuerdo a la manifestación de la distopia cantorum.

A nivel comportamental durante el proceso de domesticación ha sucedido importantes cambios en los genomas de los animales. Realizando estudios comparativos de genomas completos en gatos domésticos y en gatos salvajes de origen europeo y africano, se observaron cambios significativos en la secuencia de 13 genes asociados al proceso de la domesticación. Estos genes están vinculados con la respuesta al miedo y aprendizaje de conductas asociadas a recompensas alimenticias (genes de comportamiento y cognición).

En el genoma humano estos genes tienen una estrecha relación con el desarrollo de la estructura cerebral y comportamiento social. Dentro de los mamíferos, los carnívoros tienen una adaptación sensorial muy extrema para poder rastrear de manera efectiva sus presas sin ser descubiertos. Los gatos presentan un amplio rango de audición para poder detectar los movimientos de sus presas. Montague *et al.*, 2014, identificaron seis genes que estarían relacionados evolutivamente con la sensibilidad auditiva en los ancestros de estos carnívoros. Mutaciones en estos genes se han detectado en casos de sordera hereditaria. Otro de los sentidos que tiene bien desarrollado y adaptado este carnívoro es el visual, que le permite cazar y atrapar presas (depredadores crepusculares). Estos autores han identificado un grupo de 20 genes asociados a este sentido y se ha visto que la presencia de mutaciones en los mismos genes en la especie humana trae como consecuencia distintas patologías visuales. Como hipótesis postulan que la excelente visión nocturna de muchos carnívoros se debe a la adquisición selectiva de mutaciones ventajosas dentro del grupo de genes asociados a la agudeza visual en condiciones de baja luminosidad. Un ejemplo interesante es el del gen *MYO7A* que codifica para una proteína que interviene en el mantenimiento del sistema auditivo y del sistema visual (doble función) y cuando hay mutaciones en dicho gen se genera la pérdida de ambos sentidos.

Los gatos, a diferencia de los perros, se consideran una especie semidomesticada debido a que muchas poblaciones no se encuentran totalmente aisladas de gatos salvajes de monte no pudiendo los humanos lograr el control de la crianza y alimentación.

La adaptación de esta especie al humano para obtener comida de manera fácil, sugiere una fuerte presión selectiva por docilidad siendo una de las principales fuerzas actuantes en las modificaciones de los primeros genomas de gatos domésticos. Por este motivo esta especie es un modelo muy interesante de estudio en genética de la domesticación.

Estudios de genómica funcional dan un papel preponderante a los microARNs no codificantes como las llaves reguladoras de la expresión de genes diana que controlan el desarrollo y crecimiento de los mamíferos. Existe nueva información que durante el proceso de domesticación del ganado la selección de mutaciones en estos microARNs así como mutaciones en los sitios de unión de éstos generarían algunos rasgos diferenciales entre los vacunos domesticados de los uros salvajes. Estos estudios surgen de comparaciones de secuencias de ADN de miles de genes codificantes entre el genoma de *Bos taurus* con un único genoma de *Bos primigenius* (extinguido) (Braud *et al.*, 2017). Estos autores identificaron unos 1.620 genes candidatos de domesticación relacionados con fertilidad, pigmentación, neurobiología, metabo-

lismo, inmunidad y caracteres productivos (producción de leche y eficiencia en la conversión de alimentos). La selección direccional de determinadas variantes reguladoras mediadas por los microARN tendría un papel preponderante en la domesticación así como en la posterior selección artificial realizada por el hombre dando lugar al ganado bovino moderno.

Como se deduce aún queda mucho camino por recorrer para alcanzar un mayor conocimiento de estos procesos en las distintas especies animales.

Referencias bibliográficas

- Belyaev** DK. 1979. Destablizing selection as a factor in domestication. *J. of Heredity* 70 (5): 301-308.
- Braud** M, Magee DA, Park SDE, *et al.* 2017. Genome-Wide microRNA Binding Site Variation between Extinct Wild Aurochs and Modern Cattle Identifies Candidate microRNA-Regulated Domestication Genes. *Frontiers in Genetics*; 8:3. doi: 10.3389/fgene.2017.00003.
- Casas** A, Guevara J T, Parra F. 2016. Domesticación en el continente americano. Vol I Cap. 5. Universidad Nacional Autónoma de México. Edit. Universidad Nacional Agraria La Molina-Perú. ISBN 978-612-4147-59-3
- Gellon** G. 2010. Mendel versus Darwin ¿Qué se aprende de realizar comparaciones? *Ciencia Hoy*. Volumen 20 número 119.
- Gordon** Childe V. 1978. Los orígenes de la civilización. Madrid: F.C.E. ISBN 84-375-0015-X.
- Pardié** M, Balemián N, Llambí S. 2017. Principales enfermedades hereditarias de los equinos. *Rev. Opción Veterinaria* ene-feb 2017. Número 5, pag. 9:13, <http://www.opcionveterinaria.com.uy/>
- Janowitz** Koch I, Clark M, Thompson MJ, *et al.* 2016. The concerted impact of domestication and transposon insertions on methylation patterns between dogs and grey wolves. *Mol Ecol.* 25: 1838-1855.
- Pardié** M, Lanfranco R, Balemián N, Llambí S. 2017. Quién es quién en la genética de la domesticación de animales domésticos?. *Rev. Opción Veterinaria* (en Prensa).
- Philipp** U, Lupp B, Mömke S, Stein V, Tipold A, Eule JC, Rehage J, Distl O. 2011. A MITF mutation associated with a dominant white phenotype and bilateral deafness in German Fleckvieh cattle. *PLoS One*, 6(12): e28857.
- Price** EO. 1984. Behavioral aspects of animal domestication. *The Quarterly Review of Biology*, 59, 1-32. doi: 10.1086/413673.
- Lattig** M, Tamayo M. 1999. Síndrome de Waardenburg. Colección derecho a vivir en desventaja. Facultad de Medicina. Universidad Pontificia Javeriana. <http://www.sciencemag.org/news/2017/04/where-did-your-dog-come-new-tree-breeds-may-hold-answer>

- Montague MJ, et al., 2014.** Comparative analysis of the domestic cat genome reveals genetic signatures underlying feline biology and domestication. PNAS. 111 (48) 17230-17235.
- Wilkins A, Richard W, Tecumseh F. 2014.** The “Domestication Syndrome” in Mammals: A Unified Explanation Based on Neural Crest Cell Behavior and Genetic. Genetics, Vol. 197, 795–808.
- Zeder M. 2015.** Core questions in domestication research. PNAS. vol. 112. no. 11: 3191–3198.
- Zhang L, et al., 2012.** Progress of genome wide association study in domestic animals. Journal of Animal Science and Biotechnology, 3:26 <http://www.jasbsci.com/content/3/1/26>.



Capítulo VI

EPIGENÉTICA. TRANSCRIPTOMAS Y REGULACIÓN EPIGENÉTICA EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS

Definición y conceptos básicos

Cuando a lo largo de la Historia de la Humanidad se comienza con la domesticación de los animales y con la agricultura, el criador, además de seleccionar para la reproducción a aquellos animales que le han proporcionado mayores rendimientos, en la producción de carne o de leche, sabe muy bien que la alimentación, la higiene y otros factores externos son necesarios para lograr e incluso mejorar ese rendimiento en la descendencia. Igualmente le sucede al agricultor, él sabe que no sólo debe sembrar las semillas mejores, sino que las condiciones meteorológicas y la situación del terreno van a ser decisorias para una buena cosecha.

La Mejora Genética, estudia la proporción del componente genético y del componente ambiental que hay en la expresión de un carácter de producción (tamaño de la camada, carne, leche, etc.). Hay caracteres que están controlados por numerosos genes, que tienen un efecto aditivo y en cuya expresión el ambiente juega un papel decisivo.

Pero el conocimiento del por qué sucede esto en unos genes y no en todos, por qué hay expresiones diferentes en gemelos univitelinos, cuando se sabe que ambos tienen la misma información genética; el por qué de las respuestas y funciones distintas de los billones de células que componen un organismo de una especie superior, que están organizadas en más de 200 tipos celulares diferentes, cuando todas ellas tienen el mismo ADN; por qué el manejo que se hace en los animales de producción es tan determinante y sus consecuencias, favorables o desfavorables,

pasan a las generaciones posteriores; estos y otros interrogantes han estado siempre presentes.

A todos ellos está tratando de responder la Epigenética.

¿Qué es la Epigenética?

La Epigenética (del griego *epi*, *en* o *sobre*, y *-genética*) se refiere al estudio de determinados factores, que no son propiamente genéticos, pero que van a influir en el desarrollo de un organismo (ontogenia), desde el momento en que el óvulo es fertilizado por un espermatozoide hasta la etapa de envejecimiento y senescencia del organismo.

A nivel intrínseco es un mecanismo que implica un conjunto de reacciones bioquímicas que van a modificar al ADN sin que su secuencia se vea alterada y a proteínas de la cromatina (histonas). Este fenómeno se va a ver reflejado en el fenotipo del organismo. El término lo utilizó por primera vez Conrad Hal Waddington en 1942, para referirse al estudio de las interacciones entre genes y ambiente que se producen en los seres vivos. (Waddington, 1939 y 1942; Berger *et al.* 2009).

La Epigenética se dedica a conocer la causa y el origen de los efectos externos a la genética que modifican la expresión de los genes sin alterar la secuencia nucleotídica.

La causa molecular de los fenómenos epigenéticos reside en:

1. Modificaciones químicas del ADN (metilación)
2. Modificaciones de las proteínas histonas estrechamente unidas a él para formar la Cromatina
3. Los efectos que causan los ARNs no codificantes (ncRNAs).

Todas estas modificaciones y efectos reciben el nombre de **marcas epigenéticas**, constituyendo una capa adicional de información denominada **epigenoma** que está superpuesta a la secuencia de nucleótidos o **genoma**.

En el año 2003, tras la finalización del Proyecto Genoma Humano y de su publicación en la revista científica Nature, en octubre de 2004, se pudo comprobar que hay mucho más, de lo que hasta entonces se pensaba, en las bases moleculares del ADN que está influenciando sobre el funcionamiento celular, el desarrollo, el envejecimiento y muchas patologías. La idea que se tenía de que los seres vivos éramos tan sólo lo que está escrito en nuestros genes desde la concepción, cambió. No es solo el concepto un gen una enzima, ya que en el genoma y en la información genética, en general, hay

expresiones suplementarias que hacen que se codifiquen pequeñas modificaciones químicas capaces de regular la expresión de multitud de genes.

La Epigenética reinterpreta conceptos conocidos y desvela nuevos mecanismos por los cuales la información contenida en el ADN de cada individuo es traducida y expresada. Concepto a concepto, se está descifrando un nuevo lenguaje del genoma y se está introduciendo la noción de que muchos factores externos al ADN pueden marcar el material genético, de una forma hasta ahora desconocida y estas marcas pueden ser transmitidas a generaciones futuras. Hasta hoy, se han podido discernir mecanismos epigenéticos en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos que incluyen desde varios tipos de cáncer, patologías cardiovasculares, neurológicas, reproductivas e inmunes, y hasta manifestaciones anómalas en la tercera o cuarta generación de descendientes de eventos como la hambruna o el estrés sufridos por sus ancestros, sin haberse producido modificaciones en su ADN.

Se sabe que la expresión génica puede presentar diferentes perfiles, debido a la información contenida en los mismos genes, pero también como respuesta a factores no genéticos (epigenéticos), como los factores ambientales y otros. Estos últimos cambios pueden permanecer estables durante muchas generaciones celulares.

Estudios realizados con gemelos monocigóticos han determinado discrepancia en la prevalencia de muchas enfermedades (Bell y Spector, 2011).

De todos los componentes ambientales o tóxicos que están relacionados con la aparición de enfermedades, muy pocos tienen la capacidad de alterar la secuencia del ADN o provocar mutaciones. En términos de biología evolutiva, la mutación al azar no es suficiente para explicar el origen de fenotipos tan diversos.

En los últimos años se está realizando un gran esfuerzo por comprender fenómenos que aparentemente no obedecían a principios genéticos conocidos. Así, los estudios sobre la denominada variegación por efecto posicional en *Drosophila* llevaron a la conclusión de que cambios en la localización cromosómica de un gen, sin afectar a su secuencia, pueden determinar si dicho gen se expresará o no. Otro ejemplo es la impronta genómica, que da lugar a que en algunos genes se silencie la copia paterna (o la materna, en otros casos). Un fenómeno similar, aunque a mayor escala, causa el silenciamiento aleatorio de uno de los dos cromosomas X durante el desarrollo embrionario en hembras de mamíferos, para asegurar así un mismo nivel de expresión génica en ambos sexos. Se sabe ahora que la causa molecular de estos y otros fenómenos epigenéticos reside en las marcas epigenéticas.

El término “epigenética” tiene diversos significados dependiendo de la disciplina biológica a que se refiera.

Así en Genética del Desarrollo, hace referencia a los mecanismos de regulación genética que no implican cambios en la secuencias del ADN.

En Biología del Desarrollo, hace referencia a la dependencia contextual de los procesos embriológicos. El contexto incluye factores epigenéticos tanto internos (materiales maternos, propiedades genéricas físicas y autoorganizativas de las células y los tejidos, procesos de regulación genética, dinámica celular y tisular) como externos (temperatura, humedad, luz, radiación, etc.).

En Biología Evolutiva, la denominación herencia epigenética engloba a los mecanismos de herencia no genéticos.

En Genética de Poblaciones se emplea la expresión variación epigenética para denominar a la variación fenotípica que resulta de diferentes condiciones ambientales (norma de reacción). Los cambios epigenéticos son cambios reversibles del ADN que hacen que unos genes se expresen o no dependiendo de condiciones externas (*polifenismo*).

Una de las fuentes de mayores modificaciones de los genes es el factor ambiental y puede afectar a uno o varios genes con múltiples funciones.

Por medio de la regulación epigenética se puede observar cómo es la adaptación al medio ambiente dada por la plasticidad del genoma, la cual tiene como resultado la formación de distintos fenotipos según el medio ambiente al que sea expuesto el organismo.

Estas modificaciones presentan un alto grado de estabilidad y, al ser heredables, se pueden mantener en un linaje celular a lo largo de muchas generaciones.

A continuación se señalan algunos conceptos básicos para comprender mejor el origen y modo de actuación de los factores epigenéticos en el genoma de los diferentes organismos:

Componentes principales del gen

El ADN. Es la llamada “molécula de la vida”, y es el principal componente del material hereditario. El modelo de la doble hélice de ADN que Watson y Crick propusieron en 1953, consta de dos moléculas de polinucleótidos (hebras) de 2 nm de diámetro, que se disponen de forma antiparalela en direcciones (5' - 3' y 3' - 5'), consta, además, de un esqueleto de azúcar-fosfato fuera de la hélice y de cuatro bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Citosina y Guanina) dentro de la hélice. Las dos cadenas están unidas por enlaces de hidrógeno (débiles) y apareadas de forma complementaria (A con T y C con G).

Las proteínas histonas y su empaquetamiento con el ADN.

Otro componente son las proteínas histonas. El ADN envuelve a las proteínas histonas formando un complejo de nucleoproteína llamado **nucleosoma**. El nucleosoma mide 6 nm y está constituido por un octámero de histonas en el que hay dos subunidades de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de las que sobresale un extremo amino, que permite la unión de otras proteínas para las funciones de transcripción, de replicación y de reparación. Está compuesto, además, por una histona H1 que se coloca en el exterior del octámero.

Las histonas experimentan una fuerte interacción básica, con el ADN ácido.

Alrededor de este octámero se coloca la molécula de ADN con dos vueltas (140 pares de bases aproximadamente).

A su vez, el nucleosoma, que posee una histona H1, se pliega en una conformación que se supone en zigzag (pero también se piensa que en helicoides o con interacciones cruzadas) interaccionando con otros nucleosomas mediante contactos entre sus moléculas H1, formando **el solenoide**, fibra de 30 nm de espesor. Las histonas H1 se disponen de manera que forman el eje central sobre el que se sitúan los nucleosomas. Por cada vuelta de la espiral hay seis nucleosomas.

El solenoide, a su vez, se enrolla en bucles de 300 nm. Si se eliminan las histonas del cromosoma en la metafase mitótica se puede ver que los cromosomas tienen un esqueleto central densamente teñido. Desde este esqueleto se proyectan lazos de ADN que comienzan y acaban en el esqueleto. Este esqueleto central llamado **andamio** está compuesto por proteínas no histónicas, como la enzima topoisomerasa II (también llamada condensina) que enlazan o separan nudos o lazos en una cadena, y también por proteínas SMC (Structural Maintenance of Chromosomes o mantenimiento de la estructura del cromosoma). En este esqueleto hay regiones especiales llamadas zonas SAR (**Scaffold Attachment Region o Regiones de Unión al Andamio**) que son zonas de la fibra de 30 nm muy ricas en amina y timina que se unen al andamio, dando lugar a la fibra de 300 nm. El empaquetamiento en este punto es de 2.000 veces la hebra de ADN.

En los sitios de unión del ADN con el andamio se encuentran genes MAR (región de unión de matriz) por lo general contienen un sitio de reconocimiento para la topoisomerasa II (implicada en la regulación de la transcripción).

La fibra de 300 nm se pliega sobre sí misma formando una espiral y empaquetando el ADN hasta 10.000 veces dando lugar a la cromátida que cuando se produce la fase de síntesis del ADN en el ciclo de reproducción celular, da lugar a la cromátida hermana y con ella, al cromosoma metafásico. La unión de las dos cromátidas hermanas se produce a través de las condensinas.

La Epigénesis. Mecanismos epigenéticos

La Epigénesis es un proceso celular normal que regula la expresión de los genes de forma que la célula disponga de las proteínas que necesite de acuerdo con el tejido en que se encuentre y la función que deba realizar en cada momento. Tanto la regulación como las marcas epigenéticas se producen gracias a los siguientes mecanismos:

1. La metilación del ADN
2. La modificación de histonas
3. Los ARN no codificantes

La metilación del ADN

Uno de los mecanismos moleculares mejor conocido es el de la metilación de residuos de citosina en posiciones específicas en la molécula del ADN.

La consecuencia típica de la metilación en una región genómica es la represión de los genes cercanos.

La metilación del ADN es una marca epigenética heredable que implica la transferencia covalente de un grupo metilo en la posición C-5 del anillo de citosina del ADN por las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs), dando lugar a la 5 metilcitosina (5mC); el grupo donador es el llamado S-adenosil-L-metionina SAM.

En organismos superiores, un grupo metilo se le añade a la citosina permitiendo la conformación cerrada de la cromatina. Por lo tanto un alto grado de metilación se asocia con el silenciamiento de genes. Una forma de controlar el grado de metilación es mediante la acción de efectos ambientales.

En los mamíferos se ha visto que la metionina, la colina, el ácido fólico y las piridoxinas (que son sustancias provenientes de la dieta) tienen como función la adición de grupos metilo. Por lo general, la metilación se da en mayor grado en las **islas CpG** que son regiones ricas en CG, con altas concentraciones de citosina y guanina de forma tal que una citosina está situada a continuación de una guanina en la secuencia lineal de bases a lo largo de la cadena del ADN. CpG es la abreviatura de “-C-fosfato-G-”, es decir, citosina y guanina separados por sólo un fosfato; el fosfato une longitudinalmente cualquiera de los dos nucleósidos en la hebra de ADN. La anotación se utiliza para distinguir esta secuencia lineal de lo que es el apareamiento de bases CG de la citosina y guanina que unen transversalmente las dos hebras complementarias. Las islas CpG suelen formar parte de la región promotora de los genes

y cuando están localizadas dentro de las secuencias del gen se denominan **CpGI**. (Bird, 2002).

Para que la metilación se produzca de forma adecuada es necesaria la presencia de la enzima **ADN metiltransferasa**, que se encarga de establecer y mantener los patrones de metilación y de las **proteínas de unión metil-CpG** que están involucradas en hacer las marcas epigenéticas de metilación. También hay evidencia de que una **ADN metilasa** contribuye a regular los patrones de metilación durante el desarrollo embrionario, aunque se desconoce su modo de acción (Mayer *et al.*, 2000).

La metilación del ADN se produce en las citosinas en cualquier contexto del genoma de los mamíferos. Pero en las células somáticas, alrededor de un 98% de la metilación del ADN, se produce en un contexto CpG. En las células madre embrionarias (ESCs) un 25 % de toda la metilación aparece en un contexto no CpG. (Bird, 2002; Chatterjee y Eccles, 2015).

La metilación del ADN se elimina normalmente durante la formación del cigoto y luego es reestablecida en el embrión aproximadamente en el momento de la implantación.

La mayor parte de la metilación del ADN es esencial para el desarrollo normal, y juega un papel muy importante en una serie de procesos clave, como la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X en las hembras de los mamíferos y la supresión de la transcripción de elementos repetitivos y de la transposición. Cuando esta metilación del ADN se desregula contribuye a la aparición de patologías diversas.

Un requisito previo para la comprensión de la función de la metilación del ADN es el conocimiento de su distribución en el genoma. En los animales el espectro de los niveles de metilación es muy amplio: por ejemplo, en el gusano *Caenorhabditis elegans* es el más bajo de los que se conocen y su genoma no codifica para una ADN metiltransferasa convencional. Otro invertebrado, *Drosophila melanogaster*, tiene un gen para la ADN metiltransferasa y también se han detectado niveles muy bajos (Lyko *et al.*, 2000).

En el extremo opuesto están los genomas de los vertebrados, los cuales tienen los niveles más altos en todo el Reino Animal. La metilación del ADN está dispersa por todo el genoma, dando lugar al término conocido como **metilación global**.

Se sabe que un alto índice de metilación de genes reguladores del ciclo celular y de reparadores del ADN, produce una mayor frecuencia de formación de tumores cancerígenos. De igual forma, cuando hay un bajo nivel de metilación (hipometilación) también se presentan numerosas patologías.

Estudios recientes han demostrado que la metilación es un mecanismo de defensa contra virus y parásitos para evitar que éstos dañen el ADN.

La hipermetilación es una de las mayores modificaciones epigenéticas responsable de que se reprima la transcripción vía región promotora de los genes supresores de tumores. La hipermetilación ocurre en las islas CpG de la región promotora, dando lugar a un silenciamiento transcripcional heredable.

La hipometilación surge principalmente por la pérdida de metilación en elementos repetitivos fuertemente metilados, incluyendo satélites (por ejemplo, SAT2) y retrotransposones (por ejemplo, LINEs), que conducen a la inestabilidad genómica y a la activación de oncogenes.

¿Cómo se pueden establecer y mantener los patrones metilados y no metilados de ADN en mamíferos al igual que los que surgen en el desarrollo embrionario?

El mantenimiento de la metilación describe los procesos que reproducen los patrones de metilación del ADN a lo largo de las generaciones de células.

El mecanismo más sencillo para el mantenimiento depende de la copia semi-conservativa del patrón parental en la hebra de la cadena de ADN (Holliday y Pugh 1975; Riggs, 1975).

La modificación de histonas

En la célula, el ADN se asocia con las histonas para formar la cromatina. El empaquetamiento del ADN en la cromatina puede hacer que grandes regiones del DNA sean inaccesibles y evitar que se produzcan procesos como la transcripción del ADN. Este es un nivel clave de regulación ya que el estado en el que se encuentre la cromatina determina el momento, el lugar y la forma en que un gen puede ser expresado o no.

Si la cromatina se encuentra en un alto grado de condensación, los elementos de transcripción no pueden acceder a dicha región del ADN y, por lo tanto, el gen no se transcribe.

En contraste, si la cromatina no se encuentra condensada, los activadores de transcripción se pueden unir a las regiones promotoras para que ocurra la transcripción del gen. Ésta es una de las formas en que se da la regulación del genoma.

Las proteínas histonas pueden ser modificadas químicamente (por acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación) y causar cambios estructurales en la cromatina.

El conjunto de alteraciones que se puede producir en las histonas llevó a establecer el llamado **código de histonas** y se creó una nomenclatura denominada **nomenclatura de Brno**, establecida por un Consorcio de laboratorios europeos para estandarizar la descripción de las modificaciones de las histonas (Turner, 2005).

Sirva como ejemplo la nomenclatura H3K27me₃, esta inscripción está definiendo la histona afectada (histona H3), seguida del aminoácido modificado (K27 que representa la lisina) y finalmente la modificación sufrida (me₃ que se trata de una trimetilación).

La desmetilación del ADN

En los mamíferos, la desmetilación de ADN también desempeña un papel importante en el desarrollo y la formación de tumores. La desmetilación del ADN, que se produce en las células germinales primordiales (PGC) y en el desarrollo temprano de embriones, es esencial para que las células vuelvan a un estado pluripotente. La mayor pérdida de metilación en las PGCs se observa dentro de los intrones, en las regiones intergénicas y en las repeticiones, y después en los exones y en los genes promotores. En el cáncer, una hipometilación genómica global, ligada a la inestabilidad genómica y a la activación del oncogén, afecta a secuencias repetitivas, a genes imprintados, a genes específicos de tejidos, oncogenes y a genes asociados con invasión y metástasis, mientras que muchos genes supresores de tumores están hipermetilados y silenciados.

Los mecanismos de la eliminación de la metilación del ADN en los mamíferos están todavía poco conocidos, aunque se han propuesto una serie de mecanismos potenciales. La desmetilación se puede llevar a cabo por citosina desaminasas, convirtiendo la 5mC a timina, seguida por una reparación T-G que reemplaza específicamente la timina por citosina.

Se demostró que la oxidación de 5mC por la familia de hidroxilasas TET también puede participar en la desmetilación (Tahiliani, 2009).

Los ARN no codificantes y el epigenoma

Existen ARNs no codificantes de proteínas (**ncRNAs**) que también contribuyen a la regulación epigenética. Un ARN no codificante (ncRNA) es una molécula de ARN que si bien es funcional tiene la particularidad de que no se traduce en una proteína.

Las moléculas de ncRNA pueden ser procesadas y participan en las vías de interferencia del ARN. Este proceso genera pequeñas moléculas de ARN que pueden inhibir la expresión génica por la interacción con el propio ADN en el núcleo, con la molécula de ARN mensajero e incluso con la proteína ya sintetizada en el citoplasma.

Varias clases de pequeños ARN no codificantes desempeñan un papel crítico en la regulación de la expresión génica tanto en plantas como en animales (Figura 1).

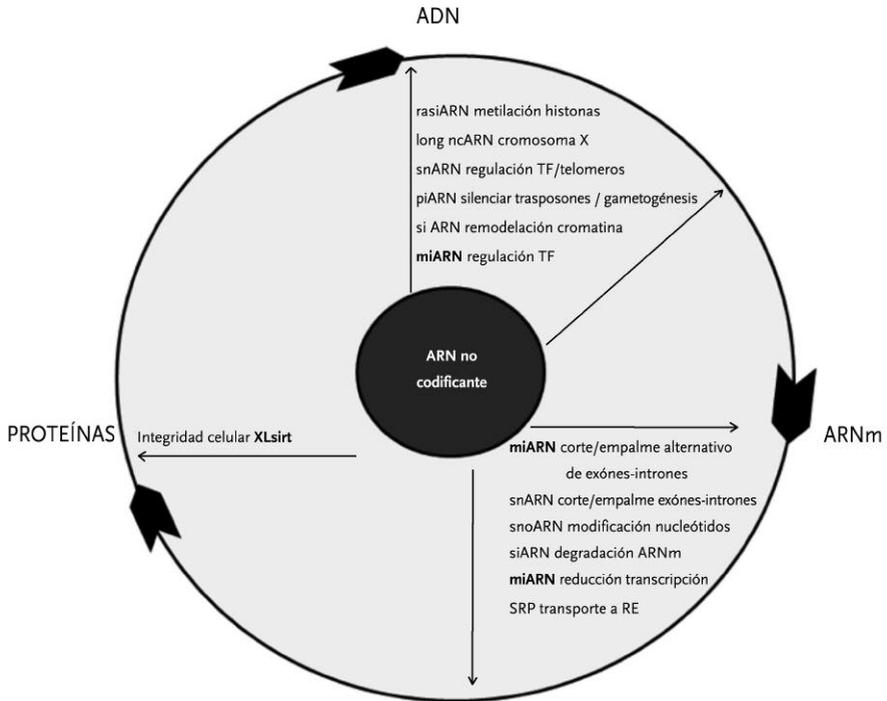


Figura 1: Tipos diferentes de ncARNs que se han descrito hasta el momento actual, con sus interferencias en los diferentes lugares de la actividad celular. ARN de transferencia (siARNs); micro ARNs (miARNs); rasi ARN; pi ARNs (piARNs).

Los procesos dirigidos por estos pequeños RNAs confieren resistencia a una variedad de sucesos celulares, tales como la infección viral y la prevención de eventos de transposición al azar dentro del genoma. Adicionalmente, pequeños RNAs son factores importantes para dirigir otros procesos epigenéticos, como la metilación del ADN y la modificación de la cromatina (Chatterjee y Eccles, 2015).

¿Qué es la impronta genética?

El imprinting o impronta genética consiste en la expresión monoalélica de genes que se encuentran en uno de los progenitores y que se expresan de forma única.

Las diferencias observadas en la expresión de estos genes improntados no son atribuibles a diferencias en la información de la secuencia de ADN, sino que lo son a modificaciones químicas específicas del ADN y de las histonas.

Desde el descubrimiento de la impronta genómica hace unos treinta años, se han identificado más de 100 genes improntados en mamíferos y se han conseguido considerables avances en el descubrimiento de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de estos genes. Aunque la mayoría de estos estudios se han centrado en modelos de ratón y humanos, trabajos recientes han puesto de relieve las contribuciones en diferentes especies de ganado doméstico. Se ha observado que la impronta genómica tiene implicaciones importantes para el futuro de la cría de animales y su mejora genética.

En los organismos diploides las células somáticas tienen dos copias del genoma. Por lo tanto, cada gen autosómico está representado por dos copias o alelos, cada una de ellas heredada de un progenitor en la fertilización. En la gran mayoría de los genes de los autosomas, se expresan las dos copias, tanto la procedente del padre, como de la madre. Sin embargo en una pequeña proporción de los genes, su expresión depende de solo uno de los alelos, pues el otro está silenciado debido a la impronta genética. La expresión del alelo depende, por tanto, de su origen parental. Por ejemplo, el gen codificante para el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (*IGF2/Igf2*), se expresa solo en el alelo heredado del padre, por lo que se tendría un caso de impronta materna.

Un gen improntado, es decir, cuando tiene uno de los dos alelos silenciado, es funcionalmente haploide, lo que elimina la protección que confiere ser diploide contra mutaciones recesivas, además, su expresión puede ser desregulada epigenéticamente. Por tanto, estos genes representan locus susceptibles de ser alterados funcionalmente tanto genética como epigenéticamente.

Es importante destacar que los genes de mamíferos que muestran la impronta genómica son distinguibles de los genes que muestran expresión parental aparente debido a las contribuciones genéticas desiguales o únicas de progenitores masculinos y femeninos, tales como la expresión de genes ligados al cromosoma Y, la expresión de los genes mitocondriales de origen materno y la expresión de los genes ligados al cromosoma X no inactivado en las hembras. Recordando que la inactiva-

ción del cromosoma X ha sido ampliamente estudiado en mamíferos desde que fue descrita por primera vez por Lyon (1961). Este mecanismo se produce durante el desarrollo embrionario temprano de la hembra, en el cual uno de los dos cromosomas X se inactiva al azar para compensar esa doble dosis de genes XX en las hembras. Este proceso, llamado “inactivación del cromosoma X o compensación de la dosis génica”, implica la unión de un cromosoma X con un ARN no codificante de proteína (denominado *Xist*), que inicia el silenciamiento de genes en todo el cromosoma X.

La impronta genómica fue descrita por vez primera por Barton *et al*, 1984; Surani *et al*, 1984 y Cattanach y Kirk, 1985. Se demostró que el desarrollo normal del embrión en ratón requiere contribuciones genéticas de ambos genomas haploides materno y paterno. Los genes en ratón, se expresan únicamente a partir de los genomas haploides maternos o paternos conjuntamente y que este conjunto de genes son necesarios para el crecimiento y el desarrollo embrionario normal. Igualmente, se observó que estos genes llevan las marcas epigenéticas específicas o ‘huellas’ que controlan la expresión monoalélica. Cuando se obtuvieron embriones ginogenéticos o androgenéticos, es decir, a partir de partenogénesis o fusión de dos pronúcleos solo maternos o solo paternos, los embriones no sobrevivieron. Estudios semejantes se realizaron en bovinos, ovinos y cerdos con resultados que revelaron el desarrollo fetal detenido y letalidad, debido a los patrones aberrantes de impronta genómica. (Sembon *et al*, 2012).

En la especie humana se han descrito 79 genes imprintados y en ratón 132. Pero en bovino, porcino y ovino tan sólo se han descrito respectivamente, 25, 21 y 14 genes imprintados (Morison *et al*, 2001 y Wei *et al*, 2014).

Muchos genes imprintados codifican para proteínas que regulan una amplia gama de procesos biológicos, sobre todo, el crecimiento y el desarrollo tanto embrionario como neonatal, el metabolismo y el comportamiento, en todas las especies de mamíferos estudiados hasta la fecha. Muchos de los genes imprintados se organizan en grupos (con un tamaño aproximado de 1 Mb) y su expresión está regulada por una región discreta denominada “**región de control de imprinting (ICR)**” que se encuentra dentro de estos grupos.

En bovino, la delección de una región de 110 kb próxima a la ICR del dominio PEG3 dio lugar a la pérdida de la expresión del gen *MIMT1*. Este gen está imprintado y se expresa paternalmente. La supresión de este gen es letal en el ganado, dando lugar a abortos y a nacimientos muertos. Es letal en el 85% de los individuos con la delección, el 15% restante de la progenie que hereda la mutación sobreviven debido al silenciamiento incompleto del alelo *MIMT1* de herencia materna.

La impronta genómica es una forma de regulación epigenética, es un mecanismo epigenético de la regulación de la expresión génica, mediante el cual las alteraciones en la expresión de genes no implican ningún cambio en las secuencias de ADN subyacentes.

Epigenética en las especies ganaderas

Epigenética y nutrición animal

Muchos ejemplos descritos por diferentes autores muestran claramente los efectos que la nutrición puede causar sobre el fenotipo. Estos efectos han sido estudiados ampliamente con respecto a las especies de animales. No cabe la menor duda, que desde el comienzo de su domesticación, la búsqueda de una mayor producción de alimentos pronto descubrió que la buena alimentación, junto con otros factores ambientales, como la higiene o la sanidad, daban lugar a una mayor producción (leche, carne, prolificidad, etc). Desde siempre se ha tenido en cuenta que la nutrición contiene señales que pueden inducir cambios fenotípicos.

Un ejemplo igualmente bien conocido se encuentra en las abejas. La jalea real está afectando al tipo de abeja que se va a formar. La producción de abejas reinas depende casi exclusivamente de la alimentación de las larvas. Las larvas que, durante todo su desarrollo, se alimentan de jalea real que contiene altas concentraciones de proteínas y secreciones de las glándulas salivales de las abejas obreras, se formarán como abejas reinas con ovarios funcionales. Por el contrario, las larvas que son alimentadas con jalea real por cortos períodos de tiempo, se convertirán en abejas obreras sin ovarios funcionales. El consumo de jalea real causa altas tasas de síntesis de la hormona juvenil (JH) en la larva. Esta hormona retrasa la metamorfosis, permitiendo que la larva se desarrolle durante más tiempo, adquiera un mayor tamaño, y desarrolle ovarios funcionales. Existe una alta correlación entre los niveles de producción de la JH y el silenciamiento del gen *Dnmt3*, que induce una reprogramación del transcriptoma larval. A su vez el silenciamiento de *Dnmt3* va a producirse por alteración en los niveles de metilación. Este es un ejemplo más donde la regulación epigenética esta controlando la organización social en cuanto a las tareas que les compete a los integrantes de la colonia.

El desequilibrio nutricional de la madre, ya sea a través de desproporciones nutricionales globales o deficiencias en ciertos nutrientes y la exposición ambiental durante los períodos críticos del desarrollo, predispone a la susceptibilidad a la enfermedad más adelante en la vida, y es que el papel de la Epigenética está siendo

evidente. El caso tan conocido de hambrunas en la especie humana cuyos descendientes sufrieron enfermedades como hipercolesterolemias, diabetes y muertes prematuras, demuestra este hecho.

Algunos nutrientes, así como componentes bioactivos de los alimentos o dietas altas o bajas en grasa, proteínas, o restricciones calóricas, etc., tienen la capacidad de modificar las marcas epigenéticas y la señalización celular durante el crecimiento y el desarrollo en la descendencia. La vitamina B-12, el ácido fólico, la colina, betaína, y metionina son nutrientes que pueden alterar el estado de metilación del ADN y las histonas. En particular, el ácido fólico ha sido ampliamente estudiado por su efecto sobre la metilación del ADN. En el ganado, la suplementación dietética con una vitamina del complejo B que incluye folato, condujo a un aumento de la tasa de concepción en la primera inseminación lo que sugiere una relación entre la metilación y la tasa de concepción en las vacas (Juchem *et al.*, 2012).

Los ácidos grasos de la dieta también pueden promover la creación de marcas epigenéticas mediante la estimulación de la expresión de genes específicos durante los períodos críticos del crecimiento. Los lípidos y componentes de lipoproteínas se interrelacionan directamente con la estructura de la cromatina influyendo en la expresión génica. La alimentación mediante una dieta de alto concentrado de paja de maíz a las vacas lecheras llevó a la alteración del estado de metilación de genes específicos que están implicados en la grasa y en la síntesis de proteínas de los tejidos mamarios (Dong *et al.*, 2014). Del mismo modo, una dieta complementada con ácidos grasos insaturados mostró alteraciones significativas en la expresión de dos enzimas histonas acetiltransferasas (Hat1 y kat2) que sugiere que los eventos epigenéticos podrían participar en la regulación del efecto de nutrientes sobre la síntesis de grasa de la leche en las vacas (Li *et al.*, 2013).

Las hijas de madres que habían sido alimentadas con un suplemento de proteínas durante el último trimestre de la preñez, presentaban en general mayores tasas de preñez, por lo que los cambios en el estado nutricional de la madre durante el periodo tardío de la gestación influyeron en el comportamiento reproductivo de las hijas (Martin *et al.*, 2007). En cerdos, el efecto tanto de la restricción de proteínas en la dieta, como el exceso durante la gestación, influyó en las marcas epigenéticas y en la expresión de genes metabólicos importantes en la descendencia (Altmann *et al.*, 2013). En cerdos destetados, Cong *et al.*, (2012) demostraron que una dieta materna baja en proteínas durante la gestación y la lactancia, afecta al metabolismo del colesterol hepático mediante la modificación de la regulación epigenética de los genes de la coenzima 3-hidroxi-3-metilglutaril reductasa y el colesterol-7 α -hidro-

xilasa, con posibles consecuencias a largo plazo en la homeostasis del colesterol en la vida adulta.

Los nutrientes también tienen efectos sobre la expresión de los genes miARN en animales de granja. Una dieta rica en grasas altera la expresión de los genes miARN en los tejidos adiposo subcutáneo y visceral de ganado. De hecho, se detectó un mayor número de miRNAs en los animales que recibieron la dieta alta en grasas en comparación con la dieta baja (Romao *et al.*, 2012). Las vacas lecheras alimentadas con dietas ricas en ácidos grasos insaturados produjeron un perfil diferencialmente regulado de miRNAs en comparación con las vacas alimentadas con dietas control (Li *et al.*, 2014). Las marcas epigenéticas responden a las señales nutricionales y por lo tanto tienen el potencial de alterar los resultados fenotípicos.

Epigenética y la regulación de la síntesis de lípidos y de la producción de leche

Los tejidos adiposos y las glándulas mamarias son los principales órganos que producen grasa, una forma importante de almacenamiento de energía. La leche y la grasa son importantes rasgos económicos de la productividad del ganado, por lo que el buen funcionamiento de las glándulas mamarias y los tejidos adiposos es vital para la productividad deseada. Se ha demostrado ampliamente el papel de las marcas epigenéticas en el crecimiento y la diferenciación de estos órganos, incluyendo el metabolismo de los lípidos y la adipogénesis (Rijnkels *et al.*, 2013). En comparación con una gran cantidad de datos conocidos sobre los seres humanos y los ratones, el papel regulador de los mecanismos epigenéticos en la síntesis de lípidos y en la producción de leche en el ganado (vacas, cabras, ovejas y cerdos), son todavía escasos.

La caracterización de miRNAs en el tejido adiposo y en las glándulas mamarias bovinas condujo a la identificación de 59 miRNAs distintos y su participación en funciones de las glándulas mamarias. Alrededor del 20% de miARNs en los tejidos adiposos bovinos están correlacionados con el espesor de la grasa dorsal (Jin *et al.*, 2010).

Se identificaron una serie de miRNAs relacionados con los depósitos de grasa en cerdos castrados lo que sugiere un papel importante en la deposición de grasa después de la castración (Bai *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2014). El examen de la metilación del ADN en tejidos adiposo y muscular de cerdos mostró que las regiones diferencialmente metiladas en los promotores de genes están altamente asociadas con el desarrollo de la obesidad a través de la represión de los genes relacionados con la obesidad.

Sobre la base de estas indicaciones, es obvio que las marcas epigenéticas regulan la síntesis de lípidos y la producción de leche. Ahora queda por determinar de qué forma pueden ser gestionados los factores epigenéticos para mejorar la calidad de la leche/carne como, por ejemplo, el aumento de la concentración de ácidos grasos deseados (ácido linoleico conjugado) en la leche y en el tejido muscular.

La Epigenética y la Sanidad animal

Influencias de los factores epigenéticos en la producción de tumores

El cáncer tiene una base genética y una base epigenética. Los cambios genéticos son frecuentes en los tumores, sin embargo, las alteraciones directas de los genes no son el único mecanismo que conduce a patrones de expresión génica desregulada durante la carcinogénesis, ya que las alteraciones epigenéticas están omnipresentes.

El modelo de células madre del cáncer sugiere que los cambios epigenéticos son los primeros eventos en la iniciación del cáncer. Este punto de vista está fuertemente apoyado por el descubrimiento de que el silenciamiento inducido por la metilación del ADN de genes supresores de tumores, se produce en las primeras etapas de la génesis del tumor (Jin *et al.*, 2011).

Los cambios epigenéticos anómalos pueden ocurrir en las células normales bajo condiciones de estrés, tal como la inflamación crónica, antes de que surja el tumor (Zemach *et al.*, 2010). Estos autores sugirieron que la interrupción de las marcas epigenéticas en células progenitoras es un factor determinante no sólo de riesgo de aparición de cáncer, sino también en el progreso y la heterogeneidad tumoral.

En la actualidad, muchos tipos de tumoraciones están siendo analizados para encontrar las causas de su génesis y los posibles tratamientos que bloqueen su multiplicación.

La metilación del ADN en el diagnóstico del cáncer

Con respecto al cáncer se han descrito numerosas alteraciones epigenéticas en el caso de la metilación del ADN, el mecanismo más ampliamente estudiado del control epigenético de la expresión génica es la hipometilación global en las células tumorales que conduce a una inestabilidad cromosómica (del genoma), inestabilidad que es fundamental para la carcinogénesis (Cancer Genome Atlas Research Network 2013). Al mismo tiempo, se ha identificado la hipermetilación de regiones promotoras en una amplia mayoría de los genes supresores de tumores, que están fuertemente asociados con el desarrollo del tumor (Grossmann *et al.*, 2012). Las

células tumorales no solo se caracterizan por presentar la metilación del ADN, sino que también por presentar la modificación en la estructura de la cromatina (Ohgami y Arber, 2015).

El afianzamiento de estos estudios ha revelado que la regulación epigenética reside en el carácter reversible de los cambios epigenéticos. Por lo que éstos pueden ser controlados químicamente mediante diferentes tratamientos.

De forma más intensa se han llevado a cabo dos tipos de tratamientos: mediante inhibidores de la ADN metiltransferasa y mediante inhibidores de la histona desacetilasa (Kumar *et al.*, 2014). Algunos de ellos ya han sido aprobados para uso clínico en el tratamiento de ciertas enfermedades humanas (por ejemplo, azacitidina, decitabine, vorinostat, romidepsine y ruxolitinib), mientras que otros tratamientos están todavía bajo investigación, en diferentes fases de estudios preclínicos y clínicos; por ejemplo, la lisina histona acetiltransferasa, lisina histona metiltransferasa, arginina histona metiltransferasa, poli inhibidores polimerasa (ADP-ribosa) (Ohgami y Arber, 2015).

Las enfermedades causadas por diversos agentes, incluyendo bacterias, virus, parásitos y hongos son una amenaza importante para la productividad del ganado en todo el mundo y una de las principales causas de pérdidas de producción. Aunque se ha puesto mucho esfuerzo en el conocimiento de los mecanismos de patogénesis de granja y control de enfermedades, la erradicación completa o el tratamiento, todavía presentan desafíos importantes. La comprensión de la contribución de las marcas epigenéticas a la enfermedad puede proporcionar nuevas vías de control.

En contraste con los numerosos informes de la participación de las marcas epigenéticas en la etiología de las enfermedades humanas, existe una limitada información sobre el papel de las perturbaciones epigenéticas en las enfermedades del ganado. A raíz de los resultados de los primeros estudios en los años 1970 y 1980 que mostraron que la digestión con las enzimas tripsina y quimotripsina de timo bovino, dio lugar a la modificación del estado de la cromatina (Lewis y Chiu, 1980), sólo unos pocos estudios, hasta la fecha, han examinado la relación entre el estado epigenético de células y órganos y el desarrollo de las enfermedades del ganado (Wang *et al.*, 2013). En la mastitis bovina, la enfermedad más común y costosa del ganado lechero, Vanselow *et al.* (2006) observaron que una región hipometilada de la región promotora del gen de la caseína *S1* se vuelve hipermetilada después de la estimulación experimental de la glándula mamaria con *Escherichia coli*. Esto indica que la hipermetilación está relacionada con la infección de esta región y por lo tanto sirve como un regulador de metilación. En células de sangre periférica de vacas

Holstein se observó que la presencia de bacterias cambió el estado de metilación del ADN del promotor de *CD4* en las vacas con mastitis clínica (Wang *et al.*, 2013).

La estimulación LPS de las células mononucleares de sangre periférica de los terneros sanos dio lugar a la expresión diferencial de los genes *HDAC6*, *HDAC7* y *DNMT3A*, mientras que el tratamiento con el inhibidor de la histona desacetilasa, TSA, inhibió significativamente la expresión de tres citoquinas pro-inflamatorias (TNF, IL2 y gamma interferón IFN) lo que sugiere un papel importante de estos enzimas epigenéticos en la regulación de la expresión génica inmune bovina (Doherty *et al.*, 2013). Para determinar los mecanismos epigenéticos en la que la metilación del ADN afecta a la función del sistema inmune bovino durante el período de periparto, Paibomesai *et al.*, (2013) estimularon células T CD4 +, lymphocytes de 5 vacas lecheras Holstein, antes y después del parto, con concanavalina A (Con A) y de 3 vacas lecheras Holstein a mediados de la lactancia con ConA solo, o ConA más dexametasona, y demostraron efectos significativos en la expresión de dos citoquinas, IFN- γ tipo 1 y IL-4 tipo 2, que también fueron consistentes con los perfiles de metilación del ADN de la región promotora del gen *IFN- γ* , pero no con la región promotora del IL-4.

He *et al.*, (2012) utilizaron un enfoque de todo el genoma para determinar las modificaciones de las histonas H3K27me3 en linfocitos de sangre, en lactantes Holstein y observaron marcas K3K27me3 que afectaban al silenciamiento de genes, así como indicaciones de que la marca H3K27me3 juega su papel represor principalmente en la región reguladora de los linfocitos de bovino.

Cada vez es más claro que los miRNAs juegan un papel en la infección bovina y en la inmunidad. Los miRNAs se expresan en una amplia gama de tejidos bovinos incluidos los tejidos relacionados con la inmunidad (Vegh *et al.*, 2013). Cuatro miRNAs relacionados con la inmunidad, miR-125 ter, miR-155, miR-146a y miR-223 respondieron de manera diferencial a la estimulación de los monocitos bovinos con LPS o enterotoxina de *Staphylococcus aureus* (Dilda *et al.*, 2012). Del mismo modo, Naeem *et al.*, (2012), demostraron una regulación diferencial de cuatro microARNs: BTA-miR-181a, miR-16, miR-31 y miR223 en el tejido mamario bovino infectado con *Streptococcus uberis*, en comparación con el tejido sano.

El uso de las tecnologías de secuenciación masiva, ha demostrado la participación de miRNAs en las infecciones virales y bacterianas en bovinos. Tras la infección viral (con virus del herpes bovino 1) de una línea celular derivada de riñón de bovino adulto y posterior secuenciación, Glazov *et al.* (2009), identificaron 219 miRNAs bovinos conocidos y 268 nuevos, algunos de los cuales están implicados en la respuesta inmune del animal a la presencia del virus.

En cerdos, Tao y Xu (2013) estudiaron miARN durante el destete y el estrés y demostraron la participación de miARNs expresados diferencialmente en el metabolismo intestinal, la respuesta al estrés y funciones inmunes. Ye *et al.*, (2012) examinaron miARNs en el duodeno de lechones destetados infectados con *Escherichia coli*, sensibles y resistentes e identificaron 12 candidatos miARNs (SSC-miR-143, SSC-let-7F, SSC-miR-30e, SSC-miR 148a, SSC-miR-148b, SSC-miR-181, SSC-miR-192, SSC-miR-27b, SSC-miR-15b, SSC-miR-21, SSC-miR-215 y SSC-miR-152) marcadores de la enfermedad.

A partir de tejido de pulmón de cerdos infectados con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Podolska *et al.*, (2012) identificaron miR-664-5p, miR-451 y miR-15a como candidatos prometedores implicados en la respuesta a la infección bacteriana.

El conocimiento detallado de cómo diferentes patógenos, de importancia en la producción ganadera, dan lugar a modificaciones epigenéticas que modifican la respuesta a la enfermedad, puede ayudar al desarrollo de estrategias para gestionar con eficacia las enfermedades del ganado. Lo cual requiere de esfuerzos coordinados para hacer disponibles los mapas del epigenoma de los diferentes tipos de células inmunes en el ganado con fines de explotación para mejorar la salud de los animales.

Epigenética y la herencia transgeneracional. Reproducción Animal

No hay ninguna duda acerca del principio de que los genotipos heredados definen los fenotipos, pero la cuestión sigue siendo, sin embargo, si los fenotipos estables podrían ser también heredados vía paterna independientemente de la secuencia genética. Los datos recientes sugieren que las experiencias de comportamiento del padre se pueden transmitir a través de líneas germinales masculinas. El desafío es delinear un mecanismo plausible. En la última década se ha propuesto que los mecanismos epigenéticos están implicados en la transmisión multigeneracional de fenotipos y herencia transgeneracional. La perspectiva de que experiencias ancestrales se escriben en el epigenoma tiene enormes implicaciones para la comprensión del comportamiento, la salud y la enfermedad.

La herencia transgeneracional ha sido descrita tanto en animales como en plantas y se produce cuando un factor ambiental provoca un cambio permanente en el epigenoma de un gameto, este genoma modificado y sus fenotipos asociados pueden ser transgeneracionalmente transmitidos a las generaciones subsiguientes. La herencia transgeneracional describe un fenómeno por el que determinadas modificaciones y cambios, producidos como consecuencia de la acción de agentes externos sobre

el individuo, son heredados por su descendencia y por las generaciones siguientes. Esta herencia depende de que los cambios afecten a las células primordiales, por lo que los estados iniciales del desarrollo son los más susceptibles.

Los biólogos observaron por primera vez esta herencia epigenética transgeneracional en las plantas. Los tomates, por ejemplo, pasan marcas químicas que controlan la maduración a lo largo de las sucesivas generaciones.

Las raíces de la herencia pueden extenderse más allá del genoma, pero los mecanismos siguen siendo un enigma. El tema sigue siendo controvertido, en parte porque se remonta a las teorías desacreditadas de Jean-Baptiste Lamarck, el científico francés del siglo XIX que propuso que los organismos transmiten caracteres adquiridos a las generaciones futuras. Para muchos científicos modernos, eso produjo un cierto temor a continuar la investigación por esa vía.

La revolución de la Epigenética se inició con intensidad en la década de los 2000, cuando los científicos comenzaron a aceptar que los factores ambientales (desde la maternidad negligente a una alta contaminación ambiental o de grasas en la dieta) pueden influir en la adición o eliminación de marcas químicas en el ADN (Hughes, 2014) y estas marcas epigenéticas se transmiten de generación en generación.

Ejemplos claros de la impronta genética que afecta a la línea parental se conoce bien en los bóvidos y en particular en la especie *Bos taurus*. En esta especie se han visto genes que se encuentran implicados en fenómenos de impronta en el hipotálamo: los genes *PEG3*, *MEST/PEG1* y *NECDIN4* están sometidos a expresión monoalélica, exclusivamente paterna regulada por la impronta genética y son fundamentales para el desarrollo de los centros hipotalámicos. Otro gen muy bien descrito es el gen *IGF2*, factor de crecimiento ligado a la insulina, con efectos en el crecimiento y en el desarrollo. Este gen se expresa solo por línea paterna, mientras que está improntado por línea materna. (Postiglioni *et al.* 2009 y 2011).

La presión para mejorar económicamente importantes rasgos del ganado ha aumentado enormemente y este aumento se ha asociado con la disminución de la fertilidad. Como resultado de ello, se aplican de forma general las técnicas de reproducción asistida *in vitro*, la producción de embriones y células somáticas de transferencia nuclear/clonación para mejorar la eficiencia reproductiva en animales de granja. Sin embargo, la eficacia del desarrollo de los embriones producidos por estas tecnologías es muy diferente de sus homólogos en vivo. Hay evidencias que indican que las tecnologías de reproducción asistida posiblemente interfieren con la impronta durante la manipulación de los gametos o la pre-implantación de embriones. (Urrego *et al.*, 2014). La observación de la reprogramación de la metilación en los embriones clonados llevó a la idea de que la desmetilación y la metilación *de novo*,

no se lleva a cabo adecuadamente en embriones clonados en comparación con el desarrollo embrionario normal. Se ha observado un fracaso de la reprogramación de la modificación de histonas en embriones clonados de bovino. En comparación con los fetos normales, Couldrey y Lee (2010) observaron anomalías sutiles de metilación del ADN en los fetos clonados en mitad de la gestación. Por lo tanto, los animales clonados están plagados de problemas como complicaciones respiratorias, complicaciones hepáticas, el síndrome de descendencia grande y disfunciones de la placenta. En consecuencia, las tecnologías de reproducción asistida son responsables de una parte de la alteración epigenética durante el desarrollo.

Los miRNAs también desempeñan importantes funciones reguladoras en los procesos de reproducción del ganado, incluidos la función ovárica, el desarrollo folicular, el ciclo estral, el desarrollo fetal, el desarrollo embrionario y la espermatogénesis. Se ha caracterizado la expresión de miARNs en el ovario vacuno y porcino (Salilew-Wondim *et al.*, 2014), se han evidenciado los patrones de expresión de miARNs en células de la granulosa de folículos subordinados y dominantes y su posible implicación en el reclutamiento folicular, en la selección y en el dominio durante la fase lútea del ciclo estral bovino.

Otras funciones de miRNAs en la reproducción incluyen la prevención de la diferenciación temprana de células de la granulosa, la mediación de la respuesta de las células de la granulosa del factor de crecimiento transformante B1 en los folículos pre-antrales y la producción de estradiol el apoyo de la supervivencia de las células de la granulosa durante la ovulación, la inhibición de la expresión del factor anti-angiogénico durante luteogenesis (Otsuka *et al.*, 2008) y los reguladores de la transición folicular-lútea (McBride *et al.*, 2012).

La elucidación del papel de las marcas epigenéticas en los efectos observados después de la aplicación de las tecnologías de reproducción asistida, muestran que estas tecnologías perturban los procesos normales del desarrollo de la descendencia. Dicha información es crucial, ya que determinará las condiciones en que deben o no deben utilizarse estas tecnologías.

Epigenética en crecimiento y desarrollo animal

Las modificaciones epigenéticas en los mamíferos tienen papeles esenciales e importantes de la reprogramación del genoma y en la expresión de los genes que controlan el crecimiento y el desarrollo. El fenómeno de la impronta de genes se ha demostrado que regula una amplia gama de procesos biológicos incluyendo el cre-

cimiento fetal y el desarrollo, el metabolismo y el comportamiento. Se sabe que la impronta genómica juega un papel fisiológico en el metabolismo y en la composición corporal durante toda la vida y, como tal, contribuye a la variación y a la expresión de los rasgos complejos. Magee *et al.* (2014) resumieron los efectos de las marcas epigenéticas en el crecimiento, el desarrollo y la productividad del ganado. El examen del genoma completo reveló el efecto de la metilación del ADN sobre el desarrollo de determinados músculos.

En diferentes etapas del desarrollo en el ganado, el estado de metilación del ADN se demostró que inhibía la expresión del gen *IGF2* (Huang *et al.*, 2014). Además, se han identificado cambios en la metilación del ADN en todo el genoma en células musculares ovinas (Couldrey *et al.*, 2014) y en el músculo esquelético en cerdos jóvenes y de mediana edad (Jin *et al.*, 2014). En otro estudio, el examen del efecto de las dietas maternas, con concentración baja y alta de almidón durante la gestación, mostró una expresión diferencial de tres genes (*H19*, *IGF2R* y *DNMT3*) en el músculo *longissimus dorsi*, en terneros (Wang *et al.*, 2015).

Desde la primera experiencia de clonación de la oveja Dolly, una amplia gama de tejidos somáticos han sido utilizados para clonar con éxito una variedad de especies, incluyendo el bovino, ratón, cabra, gatos y cerdos. Sin embargo, la eficacia es muchas veces insatisfactoriamente baja debido a la reprogramación incompleta de los embriones obtenidos mediante la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). De hecho, se ha demostrado la evidencia considerable de los factores epigenéticos como la metilación del ADN y la modificación de las histonas. Varios inhibidores de las enzimas histona desacetilasas (HDACI) se han utilizado para mejorar los resultados del desarrollo de embriones clonados. Entre estos inhibidores figuran el scriptaid, butirato de sodio (NABU), ácido valproico (VPA), bishydroxamida ácido m-carboxycinnamic (CBHA), la tricostatina A (TSA), oxamflatina, ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), LBH589, CUDC-101, PXD101. Jin *et al.*, 2016, demuestran que el uso de MGCD0103, que inhibe las isoformas de clase I de HDAC e induce hiperacetilación de las histonas H3 y H4, favorece el desarrollo embrionario de embriones porcinos obtenidos por transferencia de células somáticas.

En general, el incremento de los niveles de la acetilación de histonas (hiperacetilación) están asociados con que se produzca el proceso transcripcional, mientras que los niveles bajos de acetilación de las histonas (hipoacetilación) están asociados con la represión de la expresión génica.

Estos hallazgos indican que los factores epigenéticos desempeñan papeles críticos en la expresión de genes, en los procesos celulares y en el desarrollo del tejido muscular en diferentes especies de ganado.

Aplicaciones de la Epigenética en la Producción Animal

Las marcas epigenéticas están influenciadas por una amplia variedad de factores tales como la nutrición, el cuidado materno, la enfermedad y el estrés y, a su vez, ejercen una enorme influencia en el genoma a través de efectos sobre la expresión génica y el resultado fenotípico en diferentes condiciones. La ganancia diaria en el ganado es el resultado de la interacción entre las prácticas mejoradas de gestión (incluyendo la forma en que los animales son alimentados, reproducidos, y criados), el genoma y el medio ambiente. Todo ello es lo que da lugar a que se produzcan los fenotipos resultantes.

Además, el uso de la información genómica en los sistemas de mejora del ganado y la obtención de datos de genotipo, se ha convertido en un área de investigación altamente priorizada. La precisión de la selección genómica también conocida como los **valores genómicos estimados (GEBV)** se basa en la asociación entre los genotipos, fenotipos e información del pedigree. La aplicación de los GEBV ha propiciado, en la mayoría de los sistemas de mejora de productos lácteos y en la cría de cerdos, el poder hacer una selección de los animales a una edad temprana y el acortar los intervalos generacionales. Cada vez son menos los toros jóvenes que son sometidos a la progenie de pruebas y matrices de valores promedio de cría, debido a la precisión de la pre-selección sobre la base de los GEBV. Por lo tanto, el uso de la información genómica en esquemas de selección ha dado lugar a una mayor productividad y también puede conducir a esquemas de mejora más sostenibles y rentables. Sin embargo, también se sabe que solo la información genómica no tiene en cuenta la totalidad de la variación hereditaria en los fenotipos del ganado. Ya que, como se ha demostrado, los marcadores epigenéticos estables pueden ser utilizados como herramientas de pronóstico para ciertos rasgos fenotípicos en los seres humanos; por lo tanto, la acción de las marcas epigenéticas, junto con sus intrincadas relaciones, está transformando la comprensión de la regulación y los efectos sobre los rasgos fenotípicos del ganado. No hay duda de que la regulación epigenética podrá tener profundas implicaciones en el desarrollo de rasgos del ganado tales como la salud, la reproducción, el desarrollo, el comportamiento, la nutrición y la producción de leche y de carne. Falta conocer los mecanismos epigenéticos para el conocimiento completo de la expresión de rasgos en la producción animal y en la etiología de las enfermedades y son, probablemente, responsables de una parte de la variación que falta conocer en las características de producción y de una parte de la heredabilidad que no se contabiliza en la estructura genética de los sistemas de evaluación.

Será mucho mejor, contar con mayor precisión la importante fuente de variación fenotípica que supone la epigenética, lo que reducirá el número de registros requeridos de las hijas para realizar estimaciones verdaderamente fiables de los efectos verdaderos de la genética sobre las expresiones fenotípicas de los animales de producción.

Para dar cuenta de la contribución epigenética en el verdadero valor genético de un individuo, debe considerarse la posibilidad de redefinir la información utilizada para el cálculo de los GEBV. Por lo tanto, se espera que la precisión de los GEBV de un individuo aumentará cuando las asociaciones incluyan tanto la información genómica como la epigenómica. Sin embargo, estos marcadores epigenéticos tienen que ser estables o mostrar evidencia de haber sido heredados transgeneracionalmente. Por otra parte, la comprensión de cómo actúan ciertos factores desencadenantes, como la dieta o las estrategias de gestión, podría conducir a mejores prácticas de manejo para aumentar la productividad.

Desafíos y progreso de la Epigenética en las especies ganaderas

Con los avances de las tecnologías de secuenciación del ADN, se está evaluando la proporción genómica de la variación en los rasgos fenotípicos del ganado, pero esto mismo no se realiza con respecto a la proporción epigenómica. Las modificaciones epigenómicas, al igual que las mutaciones del ADN, puede tener efectos perjudiciales o neutros y, además, tienen el potencial para adaptarse y responder a las señales ambientales con gran impacto en la herencia y en la cría. Los efectos de los mecanismos de regulación epigenética deben, sin embargo, ser analizados con precisión para determinar la aplicabilidad. Desafortunadamente, las actividades de investigación epigenéticas en las especies de animales de granja están actualmente limitadas en comparación con el extenso trabajo en los seres humanos. Esto se debe, en parte, al conocimiento insuficiente, a las herramientas limitadas, a la escasez de fondos y a la falta de una red global de investigadores.

Es necesaria una ampliación del conocimiento de los mapas epigenéticos para la correcta comprensión de la contribución del epigenoma a los diferentes procesos biológicos. La importancia de los mapas epigenómicos de los diferentes tipos de células, órganos y tejidos en las especies de ganado es algo incontestable.

En los seres humanos, se han desarrollado las herramientas que facilitan la investigación epigenética y ello permite la elucidación de las contribuciones epigenéticas en el desarrollo de las enfermedades. Estos mapas han permitido conocer

cómo los factores epigenéticos conducen a la aparición de distintos fenotipos. El conocimiento del epigenoma ha contribuido a una mayor comprensión de los mecanismos de desarrollo humano, incluyendo las variaciones fenotípicas entre las poblaciones, la etiología de las enfermedades y el efecto de las agresiones ambientales, entre otras. Ahora se sabe que aunque el genoma, de los más de 200 tipos de células presentes en el cuerpo humano, es el mismo, es el epigenoma el que sirve para instruir los patrones de expresión génica entre los diferentes tipos de células, en respuesta a las diferentes señales y en las diferentes etapas de desarrollo. Por lo tanto, el conocimiento del epigenotipo a los resultados fenotípicos en las diferentes especies de ganado y una mejora en la financiación de los estudios pueden atraer a que haya un mayor número de científicos que se interesen por la investigación de la epigenética en animales y por ello poder contribuir al descubrimiento y a la aplicación de las marcas epigenéticas en la producción animal.

Oportunidades de progreso

La aplicación de la información epigenómica en la cría de ganado dependerá de la disponibilidad de la secuencia del genoma de la especie en cuestión. La secuenciación de los bovinos, cerdos, ovejas y de cabra ya se ha completado (Dong *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014), por lo que este primer paso ya está dado; ahora solo falta ir completando el mapa epigenómico de las distintas células y tejidos animales.

Los avances en las tecnologías de secuenciación masiva y la caída del coste de la secuenciación han permitido avances en la investigación genómica y en la investigación epigenómica en humanos y ratones. Se espera que estas herramientas se podrán utilizar para generar información epigenómica en especies de ganado y por lo tanto identificar marcas epigenéticas que puedan ser incluidas en los programas de mejora del ganado. Igualmente, se permitirá la posibilidad de orientar elementos epigenómicos específicos para proporcionar potentes herramientas en la manipulación de la regulación de genes y en los estudios de asociación del epigenoma con enfermedades complejas. Por otra parte, los avances en las tecnologías de secuenciación del ARN están permitiendo el descubrimiento de los genes miARNs en las especies de ganado y su papel en la regulación genética.

El progreso logrado a través de las metodologías tradicionales de la cría de animales en los últimos años se ha basado en la selección sobre la base del fenotipo. Pero hay que tener en cuenta que el fenotipo es el resultado de la interacción del genotipo, del epigenotipo y de otros factores. Por lo que tanto la información genó-

mica como la epigenómica podrían haber sido aplicadas involuntariamente en la mejora genética de los animales a lo largo del tiempo. Teniendo en cuenta pruebas abrumadoras de que las marcas epigenéticas contribuyen a la aparición de diferentes fenotipos en las especies de ganado, es necesario que el objetivo principal para la próxima década sea acelerar la investigación epigenética para permitir la comprensión de cómo las marcas epigenéticas influyen en los fenotipos del ganado. La información epigenómica puede complementar la información genómica y proporcionar una mejor comprensión de las fuerzas que dan lugar a los fenotipos y aplicarlas en la mejora de las razas y especies de ganado y en las prácticas de gestión.

Conclusión

Es evidente que las marcas epigenéticas que incluyen la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y los ARN no codificante contribuyen a la regulación de los procesos biológicos en el ganado con efectos directos e indirectos sobre la reproducción, el crecimiento, la salud y los rasgos de importancia económica. Diferentes variantes genéticas y epigenéticas interactúan con los factores ambientales (por ejemplo, nutrientes, patógenos, etc.) para definir variaciones individuales y los resultados fenotípicos. Los avances en las tecnologías de genómica han hecho posible la inclusión de la información genómica en los actuales programas de cría. Pero hay que tener en cuenta que solo la información genómica no es la contribuyente de todas las variaciones fenotípicas en los caracteres de producción del ganado. La acumulación de pruebas continúa asociando las marcas epigenéticas con diferentes resultados fenotípicos en las especies de ganado que apuntan a la idea de que la variación fenotípica explicada en el ganado también es debida a factores epigenéticos. Es necesario saber cómo influyen las marcas epigenéticas sobre la aparición de las enfermedades y sobre la producción e incluir esta información para aumentar la productividad animal y la sostenibilidad.

Un factor clave en este campo es conocer la heredabilidad de cada marca epigenética de una generación a otra, lo que permite aumentar el éxito de las terapias génicas.

Estos últimos descubrimientos han llevado a considerar no sólo la expresión de los genes, sino también la manera en que dicha expresión puede ser modificada por factores ambientales. Esta interacción genes–ambiente es necesaria para que actúen los mecanismos que regulan y producen un fenotipo normal y equilibrado, pero también, como se ha señalado, es el origen de muchas patologías. La regulación

epigenética se hace por medio de cambios, como es la adición de metilos, la modificación de histonas o los efectos de los ARNs no codificantes. Todo ello puede llevar a que se den alteraciones en los lugares de acción de las enzimas, y como resultado, se pueden tener pérdidas en la estabilidad de dichas regiones. Por lo tanto, estas regiones se vuelven más sensibles a que en ellas se den variaciones cromosómicas o que se llegue a transformar la célula por pérdidas en el mecanismo de control del crecimiento o por activación de la apoptosis y den lugar a cambios en el fenotipo y a una alta posibilidad del desarrollo de anomalías y por ende de enfermedades.

El futuro está abierto.

La Epigenética no se opone a la Genética, sino que discurre paralela a ella. Sin Genética, no hay Epigenética; y ésta no puede sustituir a la primera. Oponer Epigenética a Genética es un absurdo: la mutación de un gen que codifica una ADN metilasa modificada y las marcas epigenéticas son un evento genético.

No es una respuesta contundente contra los que apoyan el determinismo genético, y echa por tierra todo el conocimiento anteriormente alcanzado. Lo que sabemos es que el genoma no es el único actuante; como hemos ido viendo en numerosos ejemplos, y otros muchos más que se conocen, hay mucho más que la simple información de bases nitrogenadas del ADN en la expresión de los genes. El reto ahora, es llegar a conocer con claridad cómo interactúan los genes entre sí y con el ambiente y cómo y por qué se crean las marcas epigenéticas que se heredan a las generaciones siguientes sin modificar el ADN.

Referencias bibliográficas

- Altmann S**, Murani E, Schwerin M, Metges CC, Wimmers K, Ponsuksili S. 2013. Dietary protein restriction and excess of pregnant German Landrace sows induce changes in hepatic gene expression and promoter methylation of key metabolic genes in the offspring. *J Nutr Biochem* 24: 484–495.
- Bai Y**, Huang JM, Liu G, Zhang JB, Wang JY, Liu CK. 2014. A comprehensive microRNA expression profile of the backfat tissue from castrated and intact full-sib pair male pigs. *BMC Genomics* 15:47.
- Barton SC**, Surani MA, Norris ML. 1984. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 311, 374–376.
- Bell JT**, Spector TD. 2011. A twin approach to unravelling epigenetics. *Trends Genet* 27(3):116-125.
- Berger SL**, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 23:781-783.

- Bird A.** 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6–21.
- Cancer Genome Atlas Research Network. 2013. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 368:2059–74.
- Cai Z, Zhang L, Chen M, Jiang X, Xu N.** 2014. Castration-induced changes in microRNA expression profiles in subcutaneous adipose tissue of male pigs. *J Appl Genet* 55: 259–266.
- Cattanach BM, Kirk M.** 1985. Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* 315, 496–498.
- Chatterjee A, Eccles M.** 2015. DNA methylation and epigenomics: new technologies and emerging concepts. *Genom Biol* 16:103.
- Cong R, Jia Y, Li R, Ni Y, Yang X, Sun Q.** 2012. Maternal low-protein diet causes epigenetic deregulation of HMGR and CYP7 α 1 in the liver of weaning piglets. *J Nutr Biochem* 23: 1647–1654.
- Couldrey C, Brauning R, Bracegirdle J, Maclean P, Henderson HV, Mcewan JC.** 2014. Genome-wide DNA methylation patterns and transcription analysis in sheep muscle. *PLoS ONE* 9:e101853.
- Couldrey C, Lee RS.** 2010. DNA methylation patterns in tissues from mid-gestation bovine fetuses produced by somatic cell nuclear transfer show subtle abnormalities in nuclear reprogramming. *BMC Dev Biol* 10:27.
- Dilda F, Gioia G, Pisani L, Restelli L, Lecchi C, Albonico F.** 2012. *Escherichia coli* lipopolysaccharides and *Staphylococcus aureus* enterotoxin B differentially modulate inflammatory microRNAs in bovine monocytes. *Vet J* 192: 514–516.
- Doherty R, O'Farrelly C, Meade KG.** 2013. Epigenetic regulation of the innate immune response to LPS in bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Vet Immunol Immunopathol* 154: 102–110.
- Dong Y, Xie M, Jiang Y, Xiao N, Du X, Zhang W.** 2013. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). *Nat. Biotechnol.* 31: 35–141.
- Dong G, Qiu M, Ao C, Zhou J, Khas E, Wang X.** 2014. Feeding a high-concentrate corn straw diet induced epigenetic alterations in the mammary tissue of dairy cows. *PLoS ONE* 9:e107659.
- Epigenomics Help.** Bethesda (MD). 2014. National Center for Biotechnology Information (US). 2010 Sep 2 (Actualizado el 2 de junio de 2014). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45786/?report=reader>
- Glazov EA, Kongsuwan K, Assavalapsakul W, Horwood PF, Mitter N, Mahony TJ.** 2009. Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection. *PLoS ONE* 4:e6349.
- Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, Eder C, Roller A, Dicker F, Schmid C, Wendtner CM, Staib P, Serve H, Kreuzer KA, Kern W, Haferlach T, Haferlach C.** 2012. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood* 120:2963-2972.

- He Y, Yu Y, Zhang Y, Song J, Mitra A, Zhang Y.** 2012. Genome wide bovine H3K27me3 modifications and the regulatory effects on genes expressions in peripheral blood lymphocytes. *PLoS ONE* 7:e39094.
- Holliday R, Pugh JE.** 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 186:226-232.
- Huang YZ, Sun JJ, Zhang LZ, Li CJ, Womack JE, Li ZJ.** 2014. Intragenic DNA methylation status down-regulates bovine *IGF2* gene expression in different developmental stages. *Gene* 534: 356–361.
- Hughes V.** Epigenetics: The sins of the father. 2014. *Nature*. 507(7490):22-24.
- Jiang Y, Xie M, Chen W, Talbot R, Maddox JF, Faraut T.** 2014. The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. *Science* 344: 1168–1173.
- Jin W, Dodson M, Moore S, Basarab J, Guan LL.** 2010. Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: a potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. *BMC Mol Biol* 11:29.
- Jin B, Li Y, Robertson D.** 2011. DNA methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy?. *Gen Cancer* 2(6): 607-617.
- Jin W, Ibeagha-Awemu EM, Liang G, Beaudoin F, Zhao X, Guan LL.** 2014. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics* 15: 181.
- Juchem SO, Robinson PH, Evans E.** 2012. A fat based rumen protection technology ruminally delivers a B vitamin complex to impact performance of multiparous Holstein cows. *Anim Feed Sci Technol* 174: 68–78.
- Kumar P, Tripathi S, Pandey KN.** 2014. Histone Deacetylase Inhibitors Modulate the Transcriptional Regulation of Guanylyl Cyclase/Natriuretic Peptide Receptor-A Gene. Interactive roles of modified histones, histone acetyltransferase, p300, and Sp1. *J Biol Chem* 289 (10):6991-7002.
- Lewis PN, Chiu SS.** 1980. Effect of histone H3 sulfhydryl modifications on histone-histone interactions and nucleosome formation and structure. *Eur J Biochem* 109: 369–376.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R.** 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926.
- Li R, Beaudoin F, Zhao X, Ibeagha-Awemu EM.** 2013. Possible involvement of Epigenetic modifying enzymes in the regulation of nutrient effect on bovine milk fat synthesis. In Proceedings of the CSAS-CMSA 2013 Joint Annual Meeting, (Banff Alberta, AB: Banff Park Lodge Resort Hotel and Conference Centre).
- Li R, Beaudoin F, Zhao X, Lei C, Ibeagha-Awemu EM.** 2014. Effect of dietary supplementation with linseed oil on the miRNome profile of the bovine mammary gland. *J Anim Sci* 92(Suppl. 2): 490.
- Lyon M.** 1961. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.) *Nature* 190:372 – 373.

- Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R.** 2000. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408: 538-540.
- Magee DA, Spillane C, Berkowicz EW, Sikora KM, Machugh DE.** 2014. Imprinted loci in domestic livestock species as epigenomic targets for artificial selection of complex traits. *Anim Genet* 45: 25–39.
- Martin JL, Vonnahme KA, Adams DC, Lardy GP, Funston RN.** 2007. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. *J Anim Sc* 85: 841–847.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., and Haaf, T.** 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403: 501-502.
- McBride D, Carré W, Sontakke SD, Hogg CO, Law A, Donadeu FX.** 2012. Identification of miRNAs associated with the follicular-luteal transition in the ruminant ovary. *Reproduction* 144: 221–233.
- Morison IM, Paton CJ, Cleverley SD.** 2001. The imprinted gene and parent-of-origin effect database. *Nucleic Acids Res* 29(1): 275-276.
- Naeem A, Zhong K, Moisés SJ, Drackley JK, Moyes KM, Looor JJ.** 2012. Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with *Streptococcus uberis*. *J Dairy Sci* 95: 6397–6408.
- Ohgami RS, Arber DA.** 2015. The diagnostic and clinical impact of genetics and epigenetics in acute myeloid leukemia. *Int Jnl Lab Hem* 37 (Supl. 1):122-132.
- Ohgami RS, Ma L, Ren L, Weinberg OK, Seetharam M, Gotlib JR, Arber DA.** 2012. DNA methylation analysis of *ALOX12* and *GSTM1* in acute myeloid leukaemia identifies prognostically significant groups. *Br J Haematol* 159:182-190.
- Otsuka M, Zheng M, Hayashi M, Lee JD, Yoshino O, Lin S.** 2008. Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J Clin Investig* 118: 1944–1954.
- Paibomesai M, Hussey B, Nino-Soto M, Mallard BA.** 2013. Effects of parturition and dexamethasone on DNA methylation patterns of *IFN-γ* and *IL-4* promoters in CD4+ T-lymphocytes of Holstein dairy cows. *Can J Vet Res* 77: 54–62.
- Podolska A, Anthon C, Bak M, Tommerup N, Skovgaard K, Heegaard P.** 2012. Profiling microRNAs in lung tissue from pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Genomics* 13:459.
- Postiglioni A, García CB, Rincón G, Arruga MV.** 2009. ¿Qué es la impronta genética?. *Albeitar* 130:42-43.
- Postiglioni A, García CB, Rincón G, Arruga MV.** 2011. Methylation specific PCR analysis in *COL8A1* promoter in Creole cattle carrier of *rob* (1;29). *Electron J Biotechnol* 14 (3): <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue3-fulltext-12>
- Proyecto Genoma Humano.** 2004. *Nature* 431:931-945.
- Riggs AD.** 1975. X-inactivation, differentiation and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14:9-25.

- Rijnkels M**, Freeman-Zadrowski C, Hernandez J, Potluri V, Wang L, Li W. 2013. Epigenetic modifications unlock the milk protein gene loci during mouse mammary gland development and differentiation. *PLoS ONE* 8:e53270.
- Romao JM**, Jin W, He M, Mcallister T, Guan LL. 2012. Altered microRNA expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissues from cattle under different diet. *PLoS ONE* 7:e40605.
- Salilew-Wondim D**, Ahmad I, Gebremedhn S, Sahadevan S, Hossain MM, Rings F. 2014. The expression pattern of microRNAs in granulosa cells of subordinate and dominant follicles during the early luteal phase of the bovine estrous cycle. *PLoS ONE* 9:e106795.
- Sembon S**, Iwamoto M, Hashimoto M, Oishi T, Fuchimoto D, Suzuki S. 2012. Porcine androgenetic embryos develop to fetal stage in recipient mothers. *Theriogenology* 78: 225–231.
- Skinner MK**, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. 2010. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab* 21(4):214-222.
- Soubry A**, Hoyo C, Jirtle RL, Murphy SK. 2014. A paternal environmental legacy: evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. *Bioessays* 36:359-371.
- Soubry A**. 2015. Epigenetic inheritance and evolution: A paternal perspective on dietary influences. *Progress Bioph Mol Biol* 3:1-7.
- Surani MA**, Barton SC, Norris ML. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308: 548–550.
- Tahiliani M**, Koh KP, Shen Y. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324(5929): 930-935.
- Tao X**, Xu Z. 2013. MicroRNA transcriptome in swine small intestine during weaning stress. *PLoS ONE* 8:e79343.
- Turner BM**. 2005. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for Modified histones. *Nat Struct Mol Biol* 12:110-112.
- Urrego R**, Rodriguez-Osorio N, Niemann H. 2014. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. *Epigenetics* 9:803–815.
- Vanselow J**, Yang W, Herrmann J, Zerbe H, Schubert HJ, Petzl W. 2006. DNA-Remethylation around a STAT5-binding enhancer in the α S1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of a α S1-casein synthesis during acute mastitis. *J Mol Endocrinol* 37: 463–477.
- Waddington CH**. 1939. Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* 25:299-307.
- Waddington CH**. 1942. The epigenotype. *Endeavour* 1:18-20.

- Wang W**, Pan K, Chen Y, Huang Ch, Zhang X. 2012. The acetylation of transcription Factor HBP1 by p300/CBP enhances p16INK4A expression. *Nucleic Acids Research* 40(3):981-995.
- Wang XS**, Zhang Y, He YH, Ma PP, Fan LJ, Wang Y. 2013. Aberrant promoter methylation of the CD4 gene in peripheral blood cells of mastitic dairy cows. *Genet Mol Res* 12: 6228–6239.
- Wang X**, Lan X, Radunz AE, Khatib H. 2015. Maternal nutrition during pregnancy is associated with differential expression of imprinted genes and DNA methyltransferases in muscle of beef cattle of spring. *J Anim Sci* 93: 35–40.
- Watson JD**, Crick FHC. 1953. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid *Nature* 171:737-738.
- Wei Y**, Yang CR, Wei YP, Zhao ZA, Hou Y, Schatten H, Sun QY. 2014. Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proc Natl Acad Sci* 111:1873-1878.
- Yang PK**, Kuroda MI. 2007. Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression. *Cell* 128:777-786.
- Ye L**, Su X, Wu Z, Zheng X, Wang J, Zi C. 2012. Analysis of differential Mirna expression in the duodenum of *Escherichia coli* F18-sensitive and – resistant weaned piglets. *PLoS ONE* 7:e43741.
- Zemach A**, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. 2010. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328(5980):916-919.



Capítulo VII

HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS QUE CONTRIBUYEN A LA MEJORA GENÉTICA DE LOS ANIMALES DOMÉSTICOS

La mejora de los animales domésticos y de las plantas que sirven de alimento a la humanidad siempre ha estado presente. Ganaderos y agricultores han sabido que una buena alimentación, sanidad, higiene, y una buena base genética son los parámetros principales para obtener una óptima producción de carne o de leche, o una buena cosecha.

Con el desarrollo de la Ciencia y de la Biotecnología se han incrementado las herramientas a aplicar para mejorar todos los anteriores parámetros en la mejora.

La Mejora genética está basada en el principio central $P = G + E$, es decir, el fenotipo de un animal (P) es el producto final de la interacción entre su genotipo o aptitud genética intrínseca (G) y su entorno o ambiente determinado (E).

La selección de los progenitores para mejorar la descendencia, tiene en cuenta mejorar la composición genética y las condiciones del ambiente. Estas condiciones comprenden todos los factores no genéticos y que están actuando sobre los genes para modificar su expresión en un sentido o en otro. Por ello, a todos los aspectos tradicionales anteriormente descritos, como la alimentación, sanidad, higiene, etc., en estos últimos años se están incorporando aquellos factores epigenéticos que también actúan sobre la expresión de los genes, sin modificar la composición genética o secuencia del ADN.

La Biotecnología en general ha permitido obtener métodos de mejora del ganado, gracias al desarrollo de la ingeniería genética que, por ejemplo, puede modificar las especies forrajeras para mejorar la nutrición, se pueden obtener microorganismos modificados genéticamente para producir aditivos alimentarios e

incluso modificar la flora intestinal, se obtienen vacunas en la lucha contra las principales enfermedades, hormonas, etc., entre otras muchas aplicaciones más.

En este capítulo sólo se van a considerar las principales aplicaciones que la biotecnología ha proporcionado a la mejora genética, es decir, a mejorar la composición genética (G), dentro de la ecuación central anterior.

Hasta ahora, la selección de los reproductores, machos y hembras, sólo podía hacerse sobre los caracteres heredados y exhibidos en la descendencia con variabilidad genética. Eran los rasgos caracterizados por la diferente heredabilidad que presentaban esos caracteres. Se pretendía obtener un progreso genético, cuya tasa, llamada también respuesta a la selección, es una función de la variación genética, de la presión de selección, es decir, la precisión en la identificación de los progenitores genéticamente superiores; del intervalo entre generaciones, que significa que cuanto más corto es el intervalo de generación, más rápido será el progreso genético; y de la intensidad de la selección, los individuos a seleccionar cuanto más se desvíen del valor medio de reproducción con respecto a sus contemporáneos, mayor será la mejora genética que producirán.

En la actualidad, se está aplicando la Biotecnología para mejorar el progreso genético y esto se hace a través de 4 factores: aumentar la variación genética, aumentar la presión de selección, reducir el intervalo entre generaciones y aumentar la intensidad de selección.

Por lo que se ha desarrollado una amplia aplicación en:

- 1) **Tecnologías reproductivas.**
- 2) **Genómica ganadera y selección asistida por marcadores (MAS).**
- 3) **Producción de animales transgénicos, y**
- 4) **Metodología CRISPR**, una verdadera revolución, en la aplicación en animales.

1) Tecnologías reproductivas

Entre las tecnologías reproductivas que se han desarrollado se encuentran:

- **La inseminación artificial (AI)**, de forma generalizada desde la congelación del semen. Es la tecnología más ampliamente utilizada en la producción de ganado, que ha permitido la selección de los sementales y la utilización de su semen en grandes números de hembras, contribuyendo a una clara mejora de la producción en el ganado lechero, por ejemplo, aumentando la precisión de la selección a pesar del aumento asociado en el intervalo generacional.

- **La multiovulación y la transferencia de embriones (MOET)**, aumentando el número de descendientes. Lo cual aumenta la mejora genética, mejorando

la intensidad de selección. En el ganado reduce el intervalo entre generaciones, ya que de esta forma se basa en la valoración de las hermanas del futuro progenitor, en lugar de en sus hijas.

- **La recogida de ovocitos (OPU), maduración “in vitro” (IVM) y fertilización “in vitro” (FIV)**, con ello aumenta tanto la precisión como la intensidad de selección; ya que mientras el número de embriones que se pueden obtener de una vaca usando MOET, está alrededor de 20 por año, utilizando estas metodologías se multiplica por 5. (George, 1997).

- **La clonación de embriones**, el hecho de que las células de un embrión en estado de mórula y blástula sean totipotentes, de cada una de estas células pueden obtenerse nuevos embriones que serán transferidos a hembras receptoras para su gestación, dando lugar a la producción de grandes cantidades de clones de animales valorados genéticamente e incluso seleccionando el sexo deseado de forma preimplantacional. De esta forma, se modifica la respuesta genética mediante la intensidad y la precisión de selección y el intervalo entre generaciones. (Figura 1).

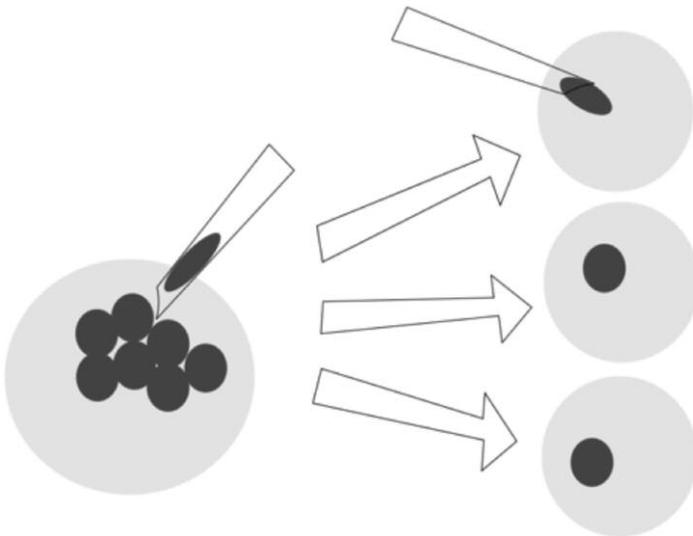


Figura 1: Esquema de clonación de embriones mediante micromanipulador.

- **La criopreservación de gametos y embriones:** La mayoría de los métodos descritos solo son efectivos cuando se usan conjuntamente con métodos de conge-

lación de gametos y embriones. Además, la criopreservación juega un papel crucial en programas de conservación destinados a mantener la diversidad genética.

2) Genómica ganadera y selección asistida por marcadores (MAS)

Ya se han identificado un gran número de marcadores genéticos cuya utilización permite localizar los genes que controlan los caracteres de interés en producción y manejo animal. Esta localización es el primer paso en el proceso denominado clonación posicional para aislar el gen de interés o la mutación. Por ejemplo, pulsando en la dirección indicada a continuación, pueden observarse, los genes localizados hasta el momento, en el ganado bovino, tanto los genes que controlan caracteres monogénicos (un gen un carácter), como los poligénicos o loci de caracteres cuantitativos (QTL), a los que pertenecen la mayoría de los caracteres de producción (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/?org=bos-taurus>).

Ya se ha demostrado que tanto en el crecimiento y las características de la canal en cerdos y en la producción de leche en vacuno, se ha obtenido una buena selección de los progenitores mediante el enfoque de la utilización de los QTL. Es lo que se llama la selección asistida por marcadores (MAS), la cual aumenta la respuesta genética afectando a los cuatro factores relevantes: aumentar la variación genética, aumentar la precisión de la selección, reducir el intervalo de generaciones y aumentar la intensidad de selección.

El beneficio de la MAS es mayor para rasgos con baja heredabilidad y cuando el marcador explica una mayor proporción de la varianza genética que el rasgo económico. Se puede obtener alrededor del 50% de ganancia genética adicional si el marcador explica el 20% de la varianza genética aditiva y el rasgo económico tiene una heredabilidad de 0.2. (Georges, 1997). La MAS también facilita una mayor tasa de ganancia genética al permitir la medición en poblaciones jóvenes, reduciendo así el intervalo entre generaciones.

Dentro de los marcadores genéticos, basados en el polimorfismo genético de los individuos de una población y que permite estudiar la variabilidad genética, se encuentran los tradicionales como los polimorfismos en enzimas, en los sistemas de grupos sanguíneos y antígenos leucocitarios y que han sido reemplazados por el polimorfismo a nivel de ADN, tanto nuclear (Jeffreys y Morton, 1987) como mitocondrial (Loftus *et al.*, 1994).

El primer polimorfismo de ADN que se usó ampliamente para la caracterización y análisis del genoma fue el polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) (Southern, 1975). Se han usado secuencias de minisatélites de aproximadamente 60 bases repetidas cientos o miles de veces, en un lugar único

dentro del genoma para generar huellas digitales de ADN típicas de individuos dentro de las especies (Jeffreys y Morton, 1987).

También se ha utilizado el ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (Williams *et al.*, 1990) para la caracterización genética de organismos. La técnica utiliza cebadores cortos (hasta 10 bases) para amplificar el ADN nuclear en la PCR. El procedimiento no requiere el conocimiento de la secuencia de ADN en estudio; los cebadores están diseñados al azar. La base del polimorfismo detectado por este método es que los productos se generan en PCR. García y Arruga en 2004 y 2005, utilizaron esta metodología para determinar diferencias en el ADN de especies avícolas como la Perdiz Roja (*Alectoris rufa*), Perdiz griega (*A. graeca*) y la chukar (*A. chukar*).

Llambí *et al.*, 2008, analizan dos poblaciones de perros de la raza Cimarrón Uruguayo utilizando un juego de los 11 marcadores RAPD polimórficos con la finalidad de comparar grupos de perros descendientes del núcleo fundador de la raza con poblaciones más lejanas dentro del mismo país. El índice de bandas compartidas obtenido por estos investigadores resultó elevado. De estos trabajos, se concluyó, que las poblaciones estudiadas presentaban una alta identidad genética perteneciendo a un núcleo genético común.

Muy utilizados han sido los marcadores microsatélites (Weber y May, 1989) que son secuencias de un número reducido de bases (2-3), siendo las más comunes las repeticiones de dinucleótidos muy abundantes en los genomas de los organismos superiores. El polimorfismo de los microsatélites toma la forma de variación en el número de repeticiones en cualquier locus dado y generalmente se analiza como la variación de la longitud de fragmentos que presenta cada alelo que se evidencia mediante los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN genómico. Para ello se utilizan cebadores que flanquean la secuencia repetida elegida y específica para un locus dado (Kemp y Teale, 1991). La facilidad de identificación y de determinación de la secuencia (Moore *et al.*, 1992) y la necesidad de pequeñas cantidades de ADN son algunas de las ventajas de los microsatélites. Además, dado que el polimorfismo de microsatélites se puede describir numéricamente, se prestan para el manejo y análisis de datos computarizados (Teale *et al.*, 1994).

Los marcadores microsatélites han servido para un gran número de estudios en la casi totalidad de las especies de animales domésticos y, dentro de ellas, de numerosas razas, permitiendo poner en evidencia las diferencias genéticas existentes y establecer los árboles filogenéticos. En una magnífica contribución a un mayor conocimiento de la estructura y de la variabilidad genética, de las relaciones filogenéticas, del proceso evolutivo. Gagliardi *et al.*, 2011 realizan la caracterización

genética del perro Cimarrón Uruguayo mediante una batería de estos marcadores. Y lo mismo en las especies de animales silvestres. Así Ansón *et al.*, 2013 y 2014, estudian la composición genética de la Perdiz Roja, mediante marcadores microsatélites, obteniendo una diferenciación genética que les permitió analizar las distancias genéticas con otras especies de perdiz.

Últimamente se ha generalizado el uso de los marcadores genéticos consistentes en la variación de una sola base nucleotídica (SNP) (Single Nucleotide Polymorphisms). Por ejemplo, un SNP puede reemplazar el nucleótido citosina (C) con el nucleótido timina (T) en un cierto tramo de ADN. Los SNP son los polimorfismos más comunes que configuran la variación genética en un organismo. Se calcula que el 90% de la variación genética se debe a polimorfismos del tipo SNP. Dado su gran número, están disponibles en diferentes regiones de un gen y en regiones genómicas estructurales. También pueden localizarse dispersos en otras regiones del genoma (Ej. en intrones de genes estructurales, en regiones intergénicas).

Los estudios de asociación de genoma completo son una forma relativamente nueva para identificar genes implicados en enfermedades, o polimorfismos genéticos que puedan proporcionar una estimación de la variabilidad genética entre animales de una misma población, raza, etc. y realizar estudios comparativos. Este método busca en el genoma estas pequeñas variaciones, que pueden ser cientos o miles de SNP al mismo tiempo.

El análisis de SNP puede realizarse sin requerir separación de ADN por tamaño y, por lo tanto, puede automatizarse en formatos de ensayo de alto rendimiento. La naturaleza dialéctica de los SNP ofrece una tasa de error mucho más baja en la llamada de alelos y aumenta el nivel de coherencia entre los laboratorios. Estas ventajas han dado lugar a que los SNP se conviertan cada vez más en marcadores de elección para la identificación precisa del genotipo y el análisis de la diversidad. Los Chips de alta densidad de SNP, (Ej. genotipado a gran escala con chips 50k, 54.000 SNPs en bovinos), han permitido el avance de la mejora genética. Cuando se habla de selección genómica con este tipo de marcadores sería como aplicar MAS a gran escala. En bovinos, se ha podido predecir el valor genético de los animales utilizando marcadores SNPs a gran escala, en caracteres de baja heredabilidad o difícil medición por su coste. A la selección de reproductores basada en este tipo de predicciones se le denomina Selección Genómica. Para realizar una mejor selección de reproductores se utilizan las denominadas DEP mejorada (Diferencia esperada en la progenie mejorada). Éstas se calculan con la información brindada, por las DEP genómicas y las DEP tradicionales, Navajas *et al.*, 2012.

Los estudios de SNP han proporcionado información valiosa a la hora de identificar variaciones genéticas en las diversas especies de animales domésticos. Así García y Arruga, en 2006 y 2007, realizan análisis de SNP y a través de los estudios de los polimorfismos presentes en las poblaciones de Perdiz Roja, chukar y griega, llegan a determinar patrones específicos para cada especie con el objetivo de diferenciar los ejemplares que pertenecen a las especies en pureza de los individuos que han sido objeto de hibridación entre dichas especies.

Llambí *et al.*, 2014, estudian por técnicas de PCR y secuenciación, dos SNPs bialélicos (M307A/G y M229C/T) del gen *Fut-1*, en poblaciones de cerdos locales (Pampa Rocha), cerdos híbridos comerciales y cerdos de razas puras comerciales.

En los tres grupos de cerdos estudiados se encontraron los dos polimorfismos con alta variabilidad alélica. En el grupo de la raza local Pampa Rocha, identificaron una frecuencia más alta del genotipo asociado con resistencia a diarrea postdestete.

Otra de las aplicaciones de los SNPs es en estudios de farmacogenética. Gagliardi *et al.*, 2015, realizan estudios de SNPs en cuatro razas caninas, para poder identificar mediante estos marcadores SNPs ligados a unos genes determinados cuyas mutaciones están implicadas en las respuestas negativas a determinados fármacos utilizados en la clínica veterinaria.

La secuenciación masiva del genoma es la última forma de caracterización genética. La secuenciación ha sido tradicionalmente costosa y laboriosa, pero con el advenimiento de la secuenciación automática, ha cambiado rápidamente.

El primer científico que desarrolló una técnica para poder leer la información genética fue Frederick Sanger, que recibió el Premio Nobel de Química en dos ocasiones. Su trabajo como bioquímico en la Universidad de Cambridge posibilitó el desarrollo del ‘método Sanger’ de secuenciación del ADN, en 1975, consistente en copiar el proceso natural de replicación del ADN.

Aunque este tipo de secuenciación permitía secuenciar sólo fragmentos más o menos largos, pero siempre reducidos y era preciso conocer la secuencia de los genomas de manera completa. Para evitar estos inconvenientes han nacido las llamadas técnicas de secuenciación masiva, o también llamadas secuenciación de segunda generación, del inglés next-generation sequencing (NGS), que presentan una gran capacidad para secuenciar millones de fragmentos de ADN, a un precio mucho más reducido.

La secuenciación completa del exoma (todos los exones de un genoma) y la secuenciación completa del genoma, son dos métodos que se utilizan cada vez más ya que permiten la secuenciación rápida de grandes cantidades de ADN.

La secuenciación completa del exoma permite identificar variaciones en la región codificante de proteínas de cualquier gen. Debido a que la mayoría de las mutaciones conocidas que causan enfermedades se producen en los exones, se cree que la secuenciación completa del exoma es un método eficiente para identificar las posibles mutaciones causantes de tales enfermedades.

Sin embargo, los investigadores han descubierto que las variaciones de ADN fuera de los exones pueden afectar la actividad de los genes y la producción de proteínas conduciendo a trastornos genéticos, estas variaciones no las detectaría la secuenciación completa del exoma. De aquí, que se haya desarrollado el segundo método de secuenciación masiva que comprende la secuenciación del genoma completo, con lo cual se determina el orden de todos los nucleótidos del ADN de un individuo y las variaciones en cualquier parte del genoma.

3) Animales transgénicos

Un animal transgénico es un animal cuyo ADN hereditario se ha aumentado mediante la adición de otro ADN procedente de un organismo diferente a través de técnicas del ADN recombinante. La transferencia de genes o construcciones génicas permite la manipulación de genes individuales en lugar de genomas enteros. Se han producido avances espectaculares en la tecnología de transferencia de genes en las últimas décadas. Se han obtenido animales transgénicos en cerdos, ovejas, conejos y bovino.

La transgénesis ofrece una oportunidad considerable para los avances en Medicina y Agricultura. En el ganado, la capacidad de insertar nuevos genes que controlan caracteres tan importantes, desde el punto de vista económico, como la fertilidad, o la producción de carne y leche, suponen un gran avance en la obtención de animales comercialmente, superiores. Otra oportunidad que brinda la tecnología transgénica es la producción de proteínas desde el punto de vista médico, como la insulina y los factores de coagulación en la leche del ganado. Los genes que codifican estas proteínas se han identificado y la construcción del factor IX humano se ha introducido con éxito en las ovejas y se ha logrado la expresión en la leche de oveja (Clark *et al.*, 1990). Además, se ha demostrado que el carácter se transmite a la descendencia (Niemann *et al.*, 1994).

Una contribución importante de la tecnología transgénica es en el área de la investigación básica para estudiar el papel de los genes en el control de los procesos fisiológicos. La comprensión del control molecular de los procesos de la vida tiene implicaciones importantes tanto para la medicina como para la agricultura. Por ejemplo, la generación (a través de la mutación de un gen endógeno) de un orga-

nismo que carece de un gen específico es una herramienta poderosa para investigar la función del producto génico. Este tipo de análisis genético se ha visto facilitado por la disponibilidad de cultivos in vitro de células madre embrionarias de ratones (Bradley, 1994).

Los avances recientes en tecnología in vitro (fertilización y maduración in vitro) han aumentado el número de cigotos disponibles para la transferencia de genes, la cual junto con la utilización de las células madre embrionarias y las células germinales primordiales, contribuyen a mejorar la eficiencia de la transferencia de genes en bovinos y ovinos, de una manera muy considerable.

El primer logro de un mamífero transgénico mediante la microinyección de construcciones genéticamente modificadas en el pronúcleo de un cigoto de ratón se llevó a cabo hace más de 20 años (Hamer *et al.*, 1985). Una gran cantidad de animales transgénicos se han producido desde entonces con fines científicos, para mejorar el ganado y para producir proteínas recombinantes. Pero para producir estas proteínas no fue hasta 2006 cuando la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMA) aprobó la antitrombina, la primera proteína recombinante derivada de la leche de cabras transgénicas (Soller *et al.*, 2006). Esta proteína fue posteriormente aprobada para su comercialización por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) como un medicamento que previene la coagulación de la sangre en pacientes con deficiencia hereditaria de antitrombina.

Los métodos actuales que permiten obtener ganado productor de proteínas incluyen la microinyección de ADN cigótico intra-pronuclear y la transferencia nuclear de células somáticas. La microinyección de ADN en el pronúcleo masculino de un cigoto es el método más comúnmente utilizado. A medida que ingresa al núcleo, el ADN lineal es capaz de integrarse en el genoma de líneas celulares u organismos vivos. El ADN generalmente se integra en las regiones pobres en genes transcripcionalmente inactivos y en la heterocromatina. Entre una a cientos de copias de l ADN inyectado pueden integrarse en un sitio genómico. Esta tecnología se probó inicialmente en ratones, y sigue siendo un método confiable para la producción de animales transgénicos. Se está usando principalmente para producir ratones transgénicos, conejos y cerdos (Maksimenko *et al.*, 2013). Esto se atribuye a la eficiencia insuficiente del método debido a la baja frecuencia de incorporación de ADN recombinante en el genoma y la disponibilidad de cigotos en las dos etapas pronucleares. El resultado depende de llevar a cabo una gran cantidad de procedimientos quirúrgicos, lo que implica la necesidad de mantener un número sustancial (200-300 cabezas) de ganado experimental y realizar una manipulación experta de los animales. Además, la única forma de determinar el nivel de expresión del trans-

gén integrado es examinar los animales transgénicos originales y sus descendientes. El ciclo reproductivo en animales grandes es de aproximadamente 0.9 - 2.3 años para hembras/machos de cabra, 1.0 - 2.3 años para cerdos, y 2.3 - 4.5 años para las vacas. Estas limitaciones aumentan el costo de obtener los animales transgénicos originales y el tiempo requerido para organizar el trabajo. (Goldman *et al.*, 2004).

En 1997, un clon de oveja se produjo por transferencia nuclear de una glándula mamaria somática en un ovocito (Wilmut *et al.*, 1997). Este logro abrió la posibilidad de desarrollar procedimientos más baratos y más fáciles para producir transgénicos agrícolas. El núcleo de la célula somática se inyecta en el oocito enucleado, que se trasplanta en las hembras receptoras.

Los efectos adversos de la técnica de transferencia nuclear incluyen una baja tasa de supervivencia del embrión en el útero y una mala salud de los animales recién nacidos. Esto se atribuye, entre otras cosas, a una reprogramación incompleta del núcleo somático, que da como resultado la expresión alterada de varios de los genes necesarios para la progresión adecuada de la embriogénesis. Además, el proceso de obtención de oocitos adecuados y su activación requiere considerables gastos de tiempo y recursos financieros.

Como indican Maksimenko *et al.*, en 2013, la tecnología de transgénesis específica de sitio que utiliza células madre embrionarias podría ser una alternativa a los métodos de microinyección de ADN y de transferencia nuclear (Zang *et al.*, 2011). Este método implica la inserción de un transgén en el genoma de células madre embrionarias, seguido de la selección de clones con una integración adecuada del número requerido de copias, antes de que las células madre embrionarias transgénicas se introduzcan en la cavidad de un blastocisto, que se trasplanta en un hembra receptora. Se ha observado que hasta el 30% de los descendientes recién nacidos pueden portar el transgén.

Todo el manejo de animales se puede realizar utilizando métodos no quirúrgicos, que son ampliamente utilizados en la cría de animales. La producción de transgénicos requiere un número relativamente pequeño de blastocistos y, por lo tanto, un pequeño rebaño experimental. Sin embargo, este método solo se ha perfeccionado para ratones y ratas. Las líneas de células madre embrionarias para animales de granja aún no se han obtenido. Un enfoque similar implica la transformación de las células madre, precursoras de las células espermáticas, para proceder a su posterior trasplante a los túbulos seminíferos de los machos infértiles.

Un método prometedor para obtener transgénicos es el uso de vectores basados en elementos genéticos móviles, que se integran en el genoma mediante la transposasa. El gen que codifica la transposasa y el transgén flanqueado por repeti-

ciones terminales del transposón se coinyectan en el cigoto. La reacción catalizada por transposasa da como resultado la integración de una única copia del transgén en uno o varios sitios del genoma del animal. Este enfoque se ha utilizado para producir animales de gran tamaño (por ejemplo, cerdos). La eficiencia de la integración del transgén en este caso depende del tipo de transposón, la longitud del transgén, la concentración y el sitio de la inyección de ADN, y puede ser tan alta como 50% (Garrels *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta ahora no se han obtenido datos con respecto a los niveles de expresión del gen objetivo en los transgénicos producidos con este método.

Los animales transgénicos están siendo un enorme potencial para incrementar la producción en ganadería y agricultura.

Ya se ha aprobado el salmón que expresa la hormona del crecimiento para uso comercial. El impacto económico en el caso del salmón transgénico se asocia con un crecimiento de casi el doble en el crecimiento, lo que reduce significativamente el costo del cultivo.

Los animales transgénicos se pueden utilizar para lograr objetivos tan importantes como producir leche modificada que contiene proteínas humanas, alterar la composición de la leche para aumentar la eficiencia en la producción de productos lácteos, mejorar las características de los animales de granja, mejorar la resistencia de los animales de granja a infecciones bacterianas, virales y priónicas.

Se han obtenido vacas transgénicas que expresan lactoferrina recombinante (3,4 mg/ml) (Yang *et al.*, 2008), lisozima (0,03 mg/ml) (Whyte y Prather, 2011), o lactoalbúmina humana (1,5 mg/ml) (Whitelaw *et al.*, 1991) para producir leche modificada. También cabras transgénicas cuya leche contiene lisozima humana recombinante a una concentración de 0,27 mg/ml (Kabotyanski *et al.*, 2009). O la producción de vacas transgénicas con el objetivo de aumentar la eficiencia en la producción de queso.

Uno de los problemas en la cría de cerdos es la alta mortalidad de lechones atribuida al contenido insuficiente de alpha-lactoalbúmina en la leche. Para abordar el problema, se han producido cerdos transgénicos con el gen de la alpha-lactoalbúmina de las vacas insertados en su genoma, lo que dió como resultado un aumento en la concentración de lactosa en la leche (Wheeler *et al.*, 2001). Esto disminuyó significativamente la tasa de mortalidad entre los lechones que fueron alimentados con leche modificada.

Otro problema en la cría de cerdos es la contaminación del medio ambiente con sus heces, que contienen altos niveles de fósforo. Este problema se resolvió produciendo cerdos transgénicos cuyo genoma contenía un gen insertado que codifica

fitasa de origen bacteriano (Golovan *et al.*, 2001). Como resultado, el nivel de fosfatos en las heces de los cerdos transgénicos disminuyó en un 75%.

La resistencia a las enfermedades es otro aspecto extremadamente importante en la aplicación de la transgénesis en la agricultura. Por ejemplo, las pérdidas ocasionadas por la mastitis (inflamación de la glándula mamaria causada por una infección bacteriana), causada por estafilococos. La lisostafina, una potente peptidoglucano hidrolasa, exhibe un efecto bactericida contra los estafilococos. Se han obtenido vacas transgénicas (Wall *et al.*, 2005) cuya leche contiene lisostafina, demostrándose que tales vacas presentaban una mayor resistencia a las infecciones por estafilococos.

La encefalopatía esponjiforme bovina (BSE, también conocida como enfermedad de las vacas locas) es la enfermedad más letal que afecta al ganado en los países del hemisferio norte. La eliminación del gen de la proteína priónica que causa la enfermedad se propuso como una forma de combatirla. Como resultado, se han producido vacas transgénicas que carecen del gen (y, por lo tanto, resistentes a la EEB) (Richt *et al.*, 2007). Es obvio que el uso de tales vacas puede reducir la incidencia y la propagación de las epidemias de enfermedades.

Estos ejemplos demuestran que el uso de los animales transgénicos es muy prometedor. La principal restricción para la distribución generalizada es el temor del público, en general, con respecto a la seguridad de los productos alimenticios transgénicos. Como resultado, se imponen requisitos reglamentarios más estrictos, lo que dificulta la obtención de permisos para utilizar los animales y productos transgénicos.

4) La metodología CRISPR

La tecnología CRISPR/Cas9 tiene su significado del acrónimo CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas, que se encuentran en el ADN de muchas bacterias y Cas9 que es el nombre de una serie de proteínas nucleasas (es decir, proteínas capaces de romper un enlace en la cadena de los ácidos nucleicos, es lo que se llaman las tijeras Cas) asociadas a CRISPR, igualmente en bacterias.

Con esta nueva metodología se puede editar o corregir el genoma de una célula de cualquier especie, porque permite cortar un fragmento de ADN de forma precisa; una vez cortado se puede eliminar esa secuencia y sustituirla por otra con la información genética deseada.

En la Universidad de Alicante los investigadores Mojica y Rodríguez-Valera (1993) trabajando con la especie *Haloferox mediterranei*, del grupo de las arqueas haló-

filas extremas, que viven en ambientes muy salinos como los que se encuentran en las cercanías de dicha Universidad. Las arqueas (Archaea, del griego [arkhaía], «las antiguas») son un grupo de microorganismos unicelulares que, al igual que las bacterias, tienen morfología procariota (sin núcleo ni, en general, orgánulos membranosos internos), pero son fundamentalmente diferentes a éstas, de tal manera que conforman su propio dominio y reino.

Cuando estos investigadores secuenciaron parte del genoma comprobaron que había repeticiones muy próximas a las regiones de respuesta a la salinidad. Se trataba de secuencias repetidas y parcialmente palindrómicas (que se leen igual al derecho y al revés). Pensaron que estas regiones representarían información genética importante para la bacteria, porque si los grupos bacterias y arqueas, que han evolucionado de forma independiente a lo largo de millones de años con procesos bioquímicos muy diferentes, las mantienen, es porque serán de vital importancia. Estas regiones son no codificantes, pero se transcriben y dan lugar a moléculas de ARN de pequeño tamaño.

Junto a las regiones CRISPR, identificaron genes denominados cas que podían tener una relación funcional con dichas regiones y por otra parte, estas regiones presentaban espaciadores que parecía exógenos provenientes de virus o plásmidos, con secuencias denominadas protoespaciadores idénticos a los espaciadores de las bacterias o virus. Estas últimas secuencias no eran capaces de infectar hospedadores que tuvieran las regiones espaciadoras correspondientes a una región CRISPR. Por lo que puede decirse que estas regiones CRISPR defienden a las bacterias de infecciones, ya que tienen enzimas capaces de distinguir el material genético del virus y, una vez hecha la distinción, destruirlo. Como indican Mojica y Almendros (2017), las regiones CRISPR y las proteínas cas forman parte de un sistema de inmunidad adquirida y que se transmite a las sucesivas generaciones de bacterias.

Cuando un virus infecta a una bacteria utiliza los componentes celulares de ésta para sintetizar su propio ácido nucleico y sus proteínas tanto estructurales como funcionales. Si la bacteria infectada por el virus posee el complejo formado por una proteína Cas unida al ARN producido a partir de las secuencias CRISPR, cuando el ácido nucleico del virus interacciona con este complejo es inactivado y degradado. Pero el sistema CRISPR va más allá, las proteínas Cas pueden tomar una pequeña parte del ADN viral, modificarlo e integrarlo dentro del conjunto de secuencias CRISPR. Así, cuando esa bacteria (o sus descendientes) sea infectada con ese virus, inactivará el efecto viral. Es por lo que se dice que estas bacterias presentan un verdadero sistema inmune contra las infecciones (Figura 2).

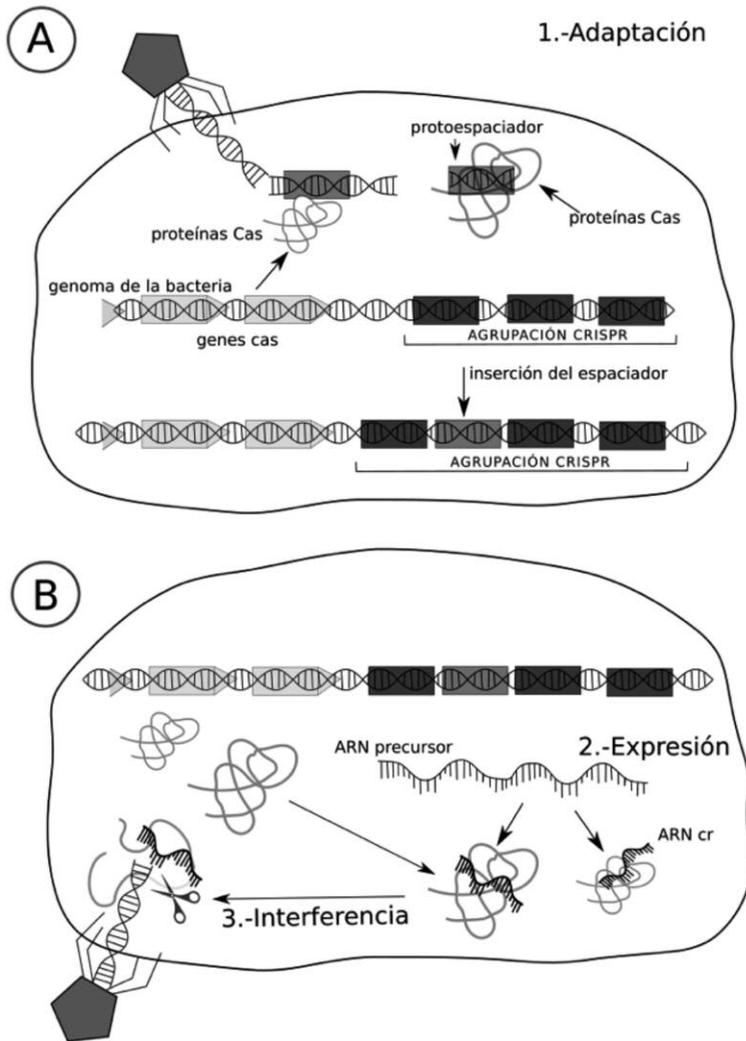


Figura 2. A: Proceso de adaptación. Un virus ADN infecta a la bacteria insertándole su información genética. Las proteínas Cas presentes en la bacteria reconocen ese ADN exógeno y forman con él un complejo proteoespaciador insertándolo en la agrupación CRISPR del ADN bacteriano. B: Procesos de expresión e interferencia. Cuando un nuevo virus del mismo grupo ataca a esa bacteria o a sus descendientes, se desencadena el proceso de expresión, sintetizándose un ARN precursor que se procesa en moléculas ARN derivadas de CRISPR (ARNcr) que van a unirse a las nuevas proteínas Cas sintetizadas formando el complejo efector. El proceso de interferencia se produce cuando estos complejos efectores reconocen el ADN del virus atacante y a modo de tijeras moleculares identifican el sitio y cortan destruyendo el genoma del virus.

La existencia en procariotas de este sistema de inmunidad adquirida es de una gran importancia biológica ya que tiene consecuencias directas sobre la supervivencia de estos organismos, y, por consiguiente, de la del resto de seres vivos.

Esta metodología se ha convertido en una herramienta molecular muy útil. Charpentier y Doudna (2012), publicaron un artículo en la revista Science en el que señalaron la posibilidad de utilizar esa maquinaria natural para poder llevar a cabo una edición “programable” del genoma de cualquier organismo vivo, puesto que esas tijeras moleculares, como se les llama, servían para cortar cualquier cadena de ADN in vitro. Se podía dirigir el sistema para que los ARN sintetizados fueran a una posición específica de un ADN cualquiera (no solo vírico) y lo cortaran (Figura 3).

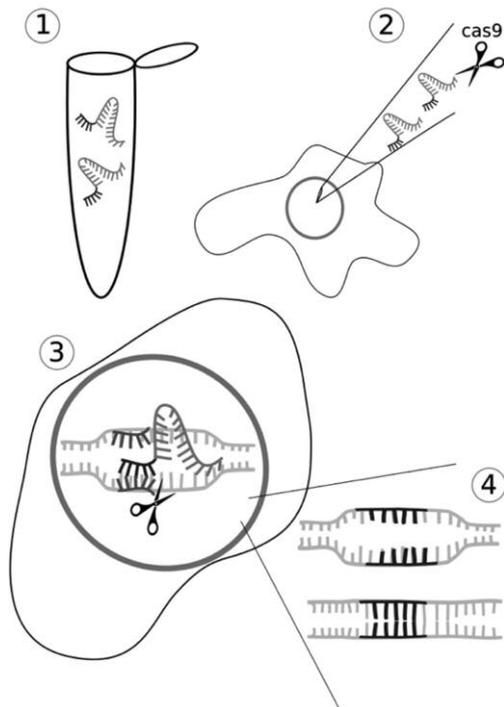


Figura 3: Esquema de edición “in vitro” de genes mediante la técnica de CRISP-Cas9.

1: Producción “in vitro” de un ARN guía que tendrá una secuencia complementaria al ADN que se quiere modificar de una célula. 2: Adición de nucleasa Cas9 y ARN guías a la célula con el gen que se quiere editar. La nucleasa Cas9 actuará

como una “tijera molecular”. 3: El ARN guía híbrida con la secuencia complementaria de ADN y Cas9 va a cortar en el sitio específico del ADN a editar. 4: Enzimas reparadoras de la célula actuarán incorporando la secuencia de nuevo ADN modificado en el sitio de corte realizado por Cas9.

Para editar un genoma con CRISPR/Cas9, es necesaria la realización de un proceso que incluye dos etapas. En la primera etapa, consta de un ARN guía que se asocia con la enzima Cas9. El ARN guía va a ser específico de una secuencia concreta del ADN, y por las reglas de complementariedad de bases nitrogenadas, hibridará en esa secuencia. Posteriormente va a actuar la enzima nucleasa Cas9, que corta el ADN en la secuencia específica. Básicamente se puede decir que el ARN guía es el que actúa de acompañante llevando al ejecutor Cas9 (“tijera moleculares”) al sitio donde ha de realizar su función.

Posteriormente en la segunda etapa se van a “encender” como mínimo dos mecanismos naturales de reparación para el ADN que ha sido cortado. El primero funciona después del sitio de corte (en la secuencia concreta del ADN) generándose un hueco o una inserción en la cadena de ADN. Por eso a este mecanismo se lo conoce como indel (inserción/delección) y lleva a la pérdida de función que tenía originalmente esa secuencia de ADN. El segundo mecanismo se acompaña de adicionar una secuencia de ADN que se quiera integrar al ADN receptor en el sitio de corte.

Con esta metodología se han obtenido alimentos, como indican Stout, *et al.*, (2017), como yogures y quesos, para evitar la contaminación de los mismos por fagos, de forma que se modifican las bacterias resistentes a la infección e incluso se están diseñando CRISPR para eliminar plásmidos que contienen genes de resistencia a antibióticos, o usarlos para eliminar bacterias patógenas.

Pero además de utilizarse en microorganismos, los componentes de los sistemas CRISPR están proporcionando un gran número de aplicaciones que actúan sobre organismos eucariotas ya que la información genética se puede modificar, eliminar, corregir, desplazar, relocalizar, etc., igualmente se puede controlar la expresión de los genes y detectar regiones concretas en un genoma, todo ello con una precisión y facilidad sin precedentes. Incluso se evitarán los organismos transgénicos, con la mala reputación que conllevan por poseer genes extraños al organismo modificado.

Estas nuevas técnicas de edición genética podrán servir, en breve, para tratar la esterilidad, no solo en humana sino en cualquiera de las especies de animales de interés veterinario, teniendo en cuenta que estos cambios se transmitirán a las generaciones siguientes por lo que serán cambios adquiridos de forma perenne. El poder

corregir la predisposición a una enfermedad grabada en el ADN y poder manipular la herencia y mejorar caracteres de producción en las especies animales es ya una posibilidad cercana que tiene consecuencias en la práctica veterinaria, ya no solo en los embriones antes de su implantación, sino ya en los gametos, tanto espermatozoides como óvulos (Hall, 2017).

Igualmente se pueden editar embriones para corregir mutaciones que causan enfermedades, realizándose en la etapa pleimplantacional. Ya se han realizado modificaciones en embriones mediante el uso de CRISPR-Cas para reparar una alteración genética asociada a una enfermedad cardíaca, y otras enfermedades.

Investigadores del MIT lograron curar la enfermedad tirosinemia (enfermedad hepática causada por la mutación de un enzima) en ratones enfermos mediante una inyección de CRISPR en la cola. Al introducir tres guías de ARN, la enzima cas9 y la secuencia correcta del ADN para el gen mutado, consiguieron insertar el gen normal en aproximadamente 250 células hepáticas de ratones, las células sanas prosperaron y sustituyeron un tercio de las dañadas y se logró curar la enfermedad (Barrangou, 2014).

Se están dando los primeros pasos para fabricar órganos y otras partes del cuerpo humano en el interior de cerdos, vacas y otros animales.

Una forma de paliar la carencia de órganos es la utilización de estas metodologías. Ya se demostrado que es posible en ratón, a los que inocularon células madre de rata en embriones de ratón especialmente diseñados y las quimeras resultantes las dejaron crecer dentro de madres sustitutas de ratón, después de la gestación las hembras parieron animales que se parecían a ratones y se comportaban como tales, pero tenían el páncreas de rata. Y también se ha hecho con embriones de cerdo, al inyectar células madre humanas se pudo comprobar que el tejido humano crecía con normalidad, se produjeron así embriones quimera que se implantaron en cerdas y al cabo de algunas semanas y sin que tuviera a término la gestación, se analizaron los embriones y se pudieron identificar células humanas incorporadas en tejidos.

En terapia génica se pueden corregir genes defectuosos ligados a enfermedades y diseñar estrategias contra el cáncer.

El aspecto transformador de CRISPR reside en su precisión, la técnica permite inactivar un gen o añadir un rasgo deseable mediante la inserción de un gen en un lugar específico del genoma. Permite superar los problemas que puedan estar dando los productos transgénicos, ya que no es necesario insertar ADN extraño en un organismo, evitando los problemas de manipulación genética entre especies diferentes.

Esta nueva técnica permite obtener cultivos resistentes a la contaminación radiactiva y ya ha sido empleada para inactivar el transporte de cesio radiactivo en el arroz. (Nieves-Cordones, 2017).

E incluso se está utilizando para incorporar ADN antiguo de especies extinguidas, para colocarlo en especies vivas y “resucitar” a aquellas especies que ya han desaparecido. Para salvar el turón patinegro se está intentando reforzar su diversidad genética inyectando ADN antiguo a individuos vivos. Se pretende reintroducir parte del ADN perdido en la especie que aún preservan los ejemplares muertos conservados en museos.

La edición genética en cerdos está siendo posible gracias a la técnica CRISPR-Cas9 ya que permite introducir grandes cambios en el ADN con una gran precisión. Están tratando a tres cerdos desprovistos de una proteína celular que actúa como puerta de entrada para el virus PRRS que produce el Síndrome respiratorio y reproductivo. Se pusieron esos tres cerdos junto a otros siete que no habían sido tratados y a todos ellos se les inoculó el virus. Cinco días después los cerdos no inyectados con CRISPR enfermaron y presentaron fiebre alta, mientras que los tres cerdos inyectados permanecieron sanos durante los 35 días que duró la experiencia. Los análisis de sangre posteriores de estos cerdos demostraron que no habían generado anticuerpos, pese al estrecho contacto con los compañeros enfermos.

Y en vacas se utilizó la técnica para producir vacas lecheras sin cuernos, con las ventajas que eso supone para un mejor manejo y cría en la ganadería. (Bruillette, 2016).

Futuro

Todavía son muchos los problemas que se plantean a la hora de generalizar las herramientas que producen un avance en los caracteres de producción en el ganado o de mejora de las características deseables en las especies de animales.

El futuro se plantea inquietante, porque por una parte se van a mejorar las producciones, se van a obtener composiciones genéticas desconocidas hasta el momento o se va a “resucitar” genomas que ya, por unas u otras razones, se habían extinguido. Esto tendrá que plantear cuestiones también éticas acerca de las consecuencias a medio y largo plazo para la conservación de los ecosistemas.

No obstante, sin entrar en objetivos futuristas, dentro de un ambiente catastrofista, todavía hay cuestiones sin resolver que se encuentran entre las cuestiones elementales del conocimiento de las especies de seres vivos. Se señalan, a continuación solo algunas de ellas.

Como determinar la función de los genes y los elementos que regulan los genes en todo el genoma.

Encontrar las variaciones o polimorfismos en la secuencia de ADN y su significado entre los individuos de una misma población y especie

Descubrir las estructuras tridimensionales de las proteínas e identificación de sus funciones.

Explorar la forma de interacción del ADN con las proteínas y con el medio ambiente para crear sistemas vivos complejos.

Desarrollar y aplicar estrategias basadas en el genoma para la detección temprana, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades.

Secuenciar los genomas de otros organismos, para comparar genes similares entre especies.

Desarrollar nuevas tecnologías para estudiar genes y ADN a gran escala y almacenar datos genómicos de manera eficiente.

Continuar explorando los problemas éticos, legales y sociales planteados por la investigación genómica.

Referencias bibliográficas

- Ansón JA, Savva D, Arruga MV.** 2014. Isolation and characterization of microsatellites in the genome of *Alectoris rufa*. *Avian Biol. Res.* 7 (2): 106-110.
- Barrangou R.** 2014. Cas9 targeting and the CRISPR revolution. *Science*, 344:707-708.
- Bruillette M.** 2016. You Can Edit a Pig, but It Will Still Be a Pig. *Scientific American* 314(3):22-22.
- Gagliardi R, Llambí S, Arruga MV.** 2015. SNP Genetic Polymorphisms of *MDR-1*, *CYP1A2* and *CYP2B11* genes in four canine breeds upon toxicological evaluation. *J Vet Sci* 16 (3): 273-280.
- Gagliardi R, Llambí S, García C, Arruga MV.** 2011. Microsatellite characterization of Cimarron Uruguayo dogs. *Genet Mol Biol.* 34 (1):165-168.
- García CB, Arruga MV.** 2004. Aplicación del estudio del DNA al conocimiento de la estructura genética de la perdiz roja (*Alectoris rufa*, L.). *Acta Veterinaria (Montevideo)* 39 (155-156): 61-65.
- García CB, Arruga MV.** 2005. Advances in DNA analysis by RAPD methodology in an avian species with little available sequence information: the red-legged partridge (*Alectoris rufa*). *Avian and Poultry Biol Rev* 16 (2): 81-86.
- García CB, Arruga MV.** 2006. Comparative genetic analysis between red-legged partridges (*Alectoris rufa*) and chukar partridges (*A. chukar*): identification of single-nucleotide polymorphisms (SNP). *Anim. Res.* 55 (4): 335-342.

- García CB**, Arruga MV. 2007. Diferenciación de especies de perdiz mediante caracterización de SNPs. Arch. Zootec. 56 (Sup 1): 403-408.
- Garrels W**, Mátés L, Holler S, Dalda A, Taylor U, Petersen B, Niemann H, Izsvák Z, Ivics Z, Kues WA. 2011. Germline transgenic pigs by Sleeping Beauty transposition in porcine zygotes and targeted integration in the pig genome. PLoS One. 6(8):e23573.
- George M**. 1997. Application of biotechnology for the genetic improvement of livestock: status and prospects. Agris: International information system for the Agricultural Science and Technology. 64.
- Goldman IL**, Kadulin SG, Razin SV. 2004. Transgenic animals in medicine: integration and expression of foreign genes, theoretical and applied aspects. Med Sci Monit. 10(11): RA274-285.
- Golovan SP**, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr MZ, Barney DJ, Plante C, Pollard JW, Fan MZ, Hayes MA, Laursen J, Hjorth JP, Hacker RR, Phillips JP, Forsberg CW. 2001. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. Nat Biotechnol. 19(8):741-745.
- Hall SS**. 2017. Modificar nuestra herencia. ¿Llegaremos a controlar nuestro destino genético?. Investigación y Ciencia. Especial 30: 18-24.
- Hammer RE**, Brinster RL, Rosenfeld MG, Evans RM, Mayo KE. 1985. Nature, 315: 413-416.
- Kabotyanski EB**, Rijnkels M, Freeman-Zadrowski C, Buser AC, Edwards DP, Rosen JM. 2009. Lactogenic hormonal induction of long distance interactions between beta-casein gene regulatory elements. J Biol Chem. 284(34): 22815-22824.
- Llambí S**, Gagliardi R, Martínez M, Estevez J, Gorozurreta A, Costa G, Bianco C, Artigas R, Arruga MV. 2008. Análisis of two populations of the uruguayan canine breed cimarron (*Canis familiaris*) using RAPD markers. MVZ Cordoba, 13 (3): 1464-1468.
- Llambí S**, Montenegro M, Castro G, Barlocco N, Vadell A, Gagliardi R, Arruga MV. 2014. Análisis poblacional de SNP del gen *Fut-1* en cerdos locales (Pampa Rocha) y comerciales utilizando técnicas de secuenciación. AICA 4: 22-24. ISSN: 2253-9727.
- Maksimenko OG**, Deykin AV, Khodarovich YM, Georgiev PG. 2013. Use of Transgenic Animals in Biotechnology: Prospects and Problems. Acta Naturae, 5(1): 33-46.
- Mojica FJM**, Juez G, Rodríguez-Valera FE. 1993. Transcription at different salinities of *Haloferox mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. Molecular Microbiology, 9: 613-621.
- Mojica FJM**, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera, F. 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the *Archaea Haloferox mediterranei* and *Haloferox volcanii* and could be involved in replicon partitioning. Mol. Microbiol. 17: 85-93.
- Mojica FJM**, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. Mol. Microbiol. 36: 244-246.

- Mojica** FJM, Garrett RA. 2012. Discovery and Seminal Developments in the CRISPR Field. In *CRISPR-Cas Systems*, R. Barrangou and J. van der Oost, eds. (Berlin, los inconvenientes de la acción Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp: 1–31.
- Mojica** FJM, Almendros C. 2017. El descubrimiento de CRISPR. *Investigación y Ciencia. Especial*. Pág.:4-11-
- Navajas** E. *et al.*, 2012. Banco de ADN genómico animal: pilar de una plataforma en selección genómica. *Rev. INIA*. N°28: 20-24.
- Nieves-Cordones** M. 2017. La técnica CRISPR permite obtener cultivos resistentes a la contaminación radiactiva. *Investigación y Ciencia. Especial* 30: 47-51.
- Richt** JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, Sathiyaseelan T, Vargas F, Sathiyaseelan J, Wu H, Matsushita H, Koster J, Kato S, Ishida I, Soto C, Robl JM, Kuroiwa Y. 2007. Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol*. 25(1):132-138.
- Soler** E, Thépot D, Rival-Gervier S, Jolivet G, Houdebine LM. 2006. Preparation of recombinant proteins in milk to improve human and animal health. *Reprod Nutr Dev*. 46(5):579-88.
- Stout** E, Klaenhammer T, Barrangou R. 2017. CRISPR-Cas technologies and applications in food bacteria. *Ann Rev Food Sci Tech* 8: 413-437.
- Wall** RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW. 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol*. 23(4):445-451.
- Wheeler** MB, Bleck GT, Donovan SM. 2001. Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health. *Reprod Suppl*. 58:313-324.
- Whitelaw** CB, Archibald AL, Harris S, McClenaghan M, Simons JP, Clark AJ. 1991. Targeting expression to the mammary gland: intronic sequences can enhance the efficiency of gene expression in transgenic mice. *Transgenic Res*. 1(1):3-13.
- Whyte** JJ, Prather RS. 2011. Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture. *Mol Reprod Dev*. 78(10-11): 879-891.
- Wilmot** I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385: 810-813.
- Yang** P, Wang J, Gong G, Sun X, Zhang R, Du Z, Liu Y, Li R, Ding F, Tang B, Dai Y, Li N. 2008. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin. *PLoS One*. 3(10):e3453.
- Zhang** Y, Yang Z, Yang Y, Wang S, Shi L, Xie W, Sun K, Zou K, Wang L, Xiong J, Xiang J, Wu J. 2011. Production of transgenic mice by random recombination of targeted genes in female germline stem cells. *J Mol Cell Biol*. 3(2):132-141.

 Este libro se termino de gestar en Zaragoza
el 7 de enero de 2018

La Genética Veterinaria está experimentando grandes cambios, por lo que nuevas aportaciones surgen para aplicarlas tanto en la clínica, como en la producción animal, en el manejo y la cría de las especies animales de interés veterinario.

Los avances en la genómica de los animales domésticos, el papel de la Epigenética, las Bases de datos OMIA, las malformaciones congénitas, la nueva tecnología CRISPR, las bases Genéticas de la domesticación, la intersexualidad en animales domésticos, entre otras, son temas de candente actualidad, que se han desarrollado mediante la colaboración entre las diversas ciencias.

Este libro trata de transmitir estos temas de manera didáctica con el fin de poner al día, los métodos y prácticas en Genética Veterinaria.



9 788469 793305
Depósito legal: Z 114-2018