

## Capítulo XIX

### **Los beneficios del diagnóstico molecular en la Ganadería Doble Propósito**

**María Gabriela Portillo**

---

Las especies bovinas representan dentro de los animales domésticos, un recurso genético de importancia vital no sólo por su potencial de desarrollo, que conlleva a beneficios económicos, sino por su relación directa con diversos aspectos de la vida del hombre. Por tal motivo, en el año 2003 surge la iniciativa de la aplicación de herramientas moleculares para secuenciar y estructurar el genoma bovino completo, con el fin de obtener información valiosa que de inmediato tendría una amplia utilidad.

#### **DETECCIÓN DE INDIVIDUOS PORTADORES DE DEFECTOS HEREDITARIOS**

Desde la década de los noventa, la genética molecular impactó con fuerza, la ganadería bovina, permitiendo el análisis de enfermedades hereditarias recesivas, que por su patrón de herencia enmascaran la presencia de individuos portadores de un defecto congénito, los cuales solo podían ser detectados mediante pruebas de progenie, retrocruces de prueba, análisis clínicos o necropsias y mediciones enzimáticas.

Entre las enfermedades hereditarias bovinas con mayor repercusión en la producción y que poseen un abordaje a través del diagnóstico molecular se encuentran: la deficiencia de adhesión de leucocitos bovinos a los antígenos (BLAD), el complejo de malformación vertebral (CMV), la deficiencia de la enzima uridina monofosfato sintetasa (DUMPS) y la Citrulinemia, exclusivas del ganado de la raza Holstein.

La granulocitopatía bovina conocida como BLAD es debido a una deficiencia del complejo glicoproteína Mac-1 (CD11b/CD18) y es letal para el ganado de la raza Holstein (Shuster et al., 1992). Se han descrito dos mutaciones que a través de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la digestión con enzimas de restricción (RFLP) han permitido la identificación eficaz del genotipo, tanto de los individuos enfermos como de los portadores (Shuster *et al.*, 1992; Tammen *et al.*, 1996). Igualmente, el complejo de malformación vertebral (CMV) reconocido como malformaciones de segmentos torácicos y cervicales de la columna vertebral en los bovinos

es causada por una mutación en el gen SLC35A3 (Thomsen *et al.*, 2006), y su detección se ha realizado a través de diferentes técnicas moleculares (Kanae *et al.*, 2005).

Para la deficiencia de la enzima uridina monofosfato sintetasa (DUMPS) que interfiere con la biosíntesis de pirimidinas, se ha establecido una prueba que analiza un fragmento de 108 pb mediante la digestión con la enzima de restricción *AvaI* (Harlizius *et al.*, 1996), la cual detecta la mutación puntual en el codón 405 del exón 5. Igualmente para el diagnóstico directo de la Citrulinemia, identificada como un desorden en el metabolismo de la urea, se emplea la PCR-RFLP (Padeeri *et al.*, 1999).

La ganadería doble propósito venezolana, no debería escapar a esta realidad, debido a que los cruces con la raza Holstein son empleados habitualmente en las prácticas agropecuarias nacionales (Aranguren *et al.*, 2007). Por tal motivo, el diagnóstico molecular directo para la detección de estos defectos, ofrecería un valor agregado a nuestra ganadería, ya que a pesar de tener una baja frecuencia en rebaños tropicales, adquieren importancia real, cuando se trata de la detección de individuos portadores antes de que ingresen en programas de inseminación artificial, lo cual ocasionará la desmanación a gran escala de un gen mutado.

Ha sido lo rápida y certera de las evaluaciones moleculares, lo que las han convertido en una información necesaria en los catálogos de toros lechero a nivel mundial, pues el paso inadvertido de estas enfermedades, ocasionaría un refuerzo en su prevalencia, a expensas de la presión de selección ejercida en los rebaños bovinos para la producción.

## **IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS CON GENOTIPOS DESEABLES PARA LA PRODUCCIÓN**

Al entrar en el ámbito productivo, las tecnologías del ADN son catalogadas como las herramientas más útiles, sensibles y poderosas para la selección de los animales mejoradores. Cuando, además de la selección por métodos convencionales, se emplean los avances moleculares, se generan resultados verdaderamente prometedores en el ámbito de la producción animal, con impacto particular en características de preferencias en el mercado y en el progreso genético de los animales (Dekkers, 2004).

Hasta estos momentos, la incorporación de tecnologías moleculares ha tenido resultados excelentes, promoviendo el estudio y la aparición de diversos genes de interés productivo que abordan principalmente la producción de carne, leche y aspectos de la reproducción, que han ayudado a dilucidar la fisiología de caracteres complejos y su efecto sobre la expresión de ciertos genotipos (Dekkers, 2007).

Funcionalmente, el genoma se divide en genes que codifican un producto traducible y secuencias no codificantes que pueden ser utilizadas como puntos de marca (marcadores) que se encuentran ligadas ó cercanas a las secuencias propias de un gen (López-Zavala *et al.*, 2007). Esta característica presenta una variabilidad polimórfica, la cual ha generado que las investigaciones modernas en el campo de la genética animal se abocaran al análisis de caracteres productivos mediante el uso de los marcadores genéticos, con el fin de identificar regiones que alberguen genes vinculados con características cuantitativas ó QTL's por sus siglas en inglés (*Quantitative Trait Loci*).

Cuando la información molecular es incorporada a planes de mejoramiento genético, aporta información veraz sobre el genotipo de uno o varios caracteres en la población de estudio. De ahí nace la selección asistida por marcadores conocida como MAS, por sus siglas en inglés (*Marker Assisted Selection*), la cual usa información acerca de estas regiones para identificar individuos con las mejores combinaciones de distintos QTL, lo cual provee información sobre la probabilidad del mérito genético de las crías (Dekkers, 2004).

En la actualidad, a pesar del desarrollo tecnológico y científico que ha construido la era de la genómica, la incorporación de información molecular de genes de interés económico en las evaluaciones genéticas no es una constante en el país. Es posible que aún persistan miedos infundados, como el pensar que el genotipado de nuestros rebaños será sumamente costoso ó que no traerá resultados tangibles, económicamente hablando.

Para los criadores parece no tener significado alguno, el cálculo de un valor de cría mucho más preciso sobre la base de marcadores moleculares. Sin embargo, el saber que al utilizar en las hembras de su rebaño, reproductores con genotipo favorable para características de interés productivo, se incrementarán de forma efectiva las ganancias, lo que debería ser más atractivo y en tal sentido, debería orientarse su promoción.

Al tratarse de características económicas de índole cuantitativo, el resultado de esta incorporación podría no sólo arrojar un valor de cría más exacto, sino también la probabilidad de aumentar un genotipo favorable en el rebaño y seleccionar animales precozmente, sin metodologías invasivas y con una exactitud mayor, aumentando la respuesta a la selección en un tiempo bastante inferior, que al usar las estrategias convencionales de selección.

La selección asistida por marcadores es principalmente beneficiosa para el estudio de rasgos fenotípicos complejos (Meuwissen & Goddard, 1996) que cumplan con las características siguientes:

- Con poca información para la predicción del valor genético.
- Índice de herencia bajo, recesivo o baja penetrancia genética.
- Con expresión limitada a un solo sexo.
- Disponibilidad fenotípica después de la madurez sexual.
- Evaluación posterior al sacrificio (Calidad de carne y características de la canal).
- Cuando la naturaleza poligénica de un carácter ha limitado la eficiencia de la evaluación tradicional.
- Costo elevado de las mediciones fenotípicas.

En el caso del ganado lechero, las condiciones desfavorables como: intervalos generacionales largos, características de interés limitadas a las hembras, pruebas de progenie costosas, que además requieren mucho tiempo y la selección de madres de toros mediante la información del pedigrí antes de su primera lactancia, hacen que sea un rasgo propicio para la aplicación de la MAS (Boichard *et al.*, 2006).

## **BENEFICIOS DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN LAS EVALUACIONES GENÉTICAS**

La industria láctea francesa mediante la incorporación de QTL's en sus evaluaciones genéticas logró reducir el número de toros para las pruebas de progenie en un 15% (Boichard *et al.*, 2006), mientras que la inclusión de marcadores moleculares de los genes de la hormona de crecimiento bovino (BGH), kappa caseína (KC) y prolactina (PRL) en las evaluaciones genéticas de rebaños lecheros colombianos, arrojó valores de hasta 90% de confiabilidad, siendo más altos que los obtenidos a través de los estimados tradicionales (Echeverri *et al.*, 2011).

En el caso de la ganadería de carne, se han desarrollado comercialmente paneles con marcadores múltiples relacionados con la calidad de la carne (Barendse, 2002; Van Eenennaam *et al.*, 2007). No obstante, su implementación debido a los altos costos del genotipado no se convirtió en una herramienta de rutina. Pese a esto, la valoración económica para la selección de toros de carne resultó ser mucho más elevada al incorporar información molecular a partir de pruebas de ADN, con un aumento en la respuesta de selección entre 29-158% (Van Eenennaam *et al.*, 2011).

Otro factor adicional que favorecería a la ganadería doble propósito en la implementación de análisis moleculares, es el hecho de que la mayoría de las unidades de producción no llevan la información fenotípica organizada y pedigrí completos; a menudo sólo están disponibles en unidades de cría intensiva, reduciendo en consecuencia, el número de individuos a ser considerado como mejoradores. Por tal motivo, sería muy útil el uso genotipificación molecular, dándole un valor agregado a aquellos individuos con poca información genealógica.

Por ser ésta una herramienta que permite el abordaje precoz de los individuos, se convierte en un instrumento particularmente útil en programas en los que se empleen técnicas de reproducción, actuando de manera sinérgica y complementaria para conducir a la selección temprana (Van der Werf & Marshall, 2003). Su aplicación permite aprovechar el incremento productivo vía hembra, mediante la fecundación *in vitro* y el acortamiento del intervalo generacional.

Asimismo, la incorporación molecular en programas de selección puede ser beneficiosa para mejorar la integración de cualidades superiores de diferentes razas, en rebaños mestizos ampliamente difundidos en Venezuela. En países tropicales y en vías de desarrollo, la balanza debería inclinarse al aumento de la respuesta general que incluya aspectos como la resistencia a enfermedades, sin limitar el trabajo en los rasgos productivos.

Bajo el contexto productivo de la ganadería nacional, la utilización de la MAS ofrece mejores maneras de aprovechar los recursos genéticos bovinos, siendo la estrategia más pertinente el estudio de marcadores genéticos ubicados en genes candidatos, como se ha hecho con el Criollo Limonero y Brahman (Aranguren *et al.*, 2010; 2011); los genes *k*-caseína (*k*-CN),  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) y Acyl-CoA-diacylglycerol-o-transferasa I (DGAT1), siguen siendo los adecuados para evaluar rendimiento y composición de la leche mientras que los genes calpastatina (CAST), calpainaCAPN, leptina (LEP) y hormona de crecimiento (GH) son útiles para evaluar producción y calidad de la carne, de tal forma que se conocería su frecuencia, el efecto sobre el fenotipo y el medio ambiente en el que se podrán desarrollar los genotipos mejoradores.

La posibilidad de decidir en forma anticipada, la conveniencia de conservar o de sacrificar a un animal, traería definitivamente beneficios productivos a cualquier empresa ganadera, no obstante, la incorporación de marcadores moleculares confiere otras ventajas tangibles, como lo expone Cañón (2006), citando entre ellas:

- El incremento en la precisión del mérito genético estimado.
- Aumento en la proporción del carácter a seleccionar.
- Precisión sobre el efecto del marcador sobre el carácter.
- Aumento en la velocidad del progreso genético en programas de selección.
- Exploración de la variabilidad genética entre poblaciones en programas de cruzamiento o de introgresión.

Es importante recordar que los genes candidatos o marcadores relacionados con características cuantitativas sólo explican una fracción de la variabilidad genética total del rasgo a seleccionar, por tal motivo, la información molecular no puede reemplazar los datos fenotípicos empleados en la selección convencional. Los mejores resultados serán obtenidos combinando ambas estrategias, incorporando nuevas etapas de selección temprana a los planes de mejoramiento con un seguimiento de la característica a través registros fenotípicos (Hayer, 2007).

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES

La utilidad de esta metodología no debe limitarse al estudio de genes de interés económico. La ganadería doble propósito por las condiciones tropicales imperantes a la que está sometida sufre la proliferación de agentes patógenos parasitarios, bacterianos y virales que reducen la productividad de las fincas; brucelosis, mastitis, leptopirosis y la diarrea viral bovina, son algunas de las enfermedades que aquejan con mucha frecuencia los rebaños mestizos. Sin un diagnóstico veraz y oportuno, el ganadero está expuesto a disminuir y aún perder los beneficios económicos que se derivan de la producción animal.

La genética molecular ofrece pruebas que permiten el diagnóstico rápido, son sensibles y accesibles de las afecciones que se presentan en el rebaño y que producen pérdidas grandes al productor de ganado bovino, con la posibilidad de su intervención oportuna para tratamientos y control.

En el caso de la brucelosis y la leptospirosis, ambas de naturaleza zoonótica y que afectan el ganado bovino de carne y leche, el diagnóstico molecular permite la identificación de las diferentes especies de *Brucella* entre ellas: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis*, y *B. suis* (Imaoka *et al.*, 2007) y en el caso de la *B. abortus* que afecta al ganado bovino, permite la diferenciación de las cepas vacunales S19, RB-51 y cepas de campo (Sangari & Agüero, 1994; Vemulapalli *et al.*, 1999). Para la identificación de leptospira se emplea el análisis del gen 16S rRNA (Gravekamp *et al.*, 1993), igualmente se cuenta el primer esquema de MLST, basado en el análisis de las secuencias de alelos de los genes *adk*, *secY*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41* y *rrs2* (Ahmed *et al.*, 2006).

Por su parte, la mastitis que en la mayoría los casos se relaciona con una infección bacteriana, el diagnóstico molecular ha respondido con el desarrollo de análisis que permiten la detección simultánea de 10 bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

*chromogenes, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus sciuri, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus simulans, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus uberis y Escherichia coli*), relacionadas con su aparición (Shome *et al.*, 2011).

En la diarrea viral bovina, por tratarse de un agente patógeno viral el diagnóstico resulta un poco más difícil; el cultivo implica la proliferación de células hospedadoras en condiciones de laboratorio, y a través de pruebas serológicas se detectan anticuerpos pero no se discrimina entre títulos vacunales y de desafío, por lo cual, deben ser tomados en animales no vacunados o sin títulos maternos. Por el contrario, las pruebas moleculares han permitido la identificación y detección del virus en muestras de campo, basados en la técnica de RT-PCR, a través de la cual se detecta el virus y se discrimina entre los diferentes genotipos virales (Weinstock *et al.*, 2001).

Entre las ventajas que ofrece el uso del diagnóstico molecular de agentes infecciosos frente a otros métodos, se observa la obtención de resultados mucho más rápidos, con una gran sensibilidad y especificidad, conjuntamente con la posibilidad de ser analizados un número grande de individuos. Asimismo, una variedad amplia de tipos de muestras pueden ser empleadas, desde sangre, leche, cualquier tipo de fluido y, tejido, hasta orina. A diferencia de las pruebas serológicas, su interpretación no requiere conocer los antecedentes del paciente o la clínica; al inicio de la infección o en etapas avanzadas de la misma, la prueba arrojará resultados. De la misma forma, no requieren que el agente patógeno este vivo para su detección, sumado a la disminución de los riesgos para el operador al trabajar con agentes zoonóticos.

## **CONCLUSIÓN. REFLEXIONES FINALES**

El diagnóstico molecular ofrece mejorar una amplia gama de aspectos de diagnóstico clínico de vital importancia en la ganadería bovina; por consiguiente, la contribución de esta biotecnología en el abordaje global de los rebaños doble propósito es inminente y útil para el establecimiento de políticas que faciliten la promoción entre los productores, al reconocimiento de las condiciones en las que desarrollan sus explotaciones, con el fin de mejorar los niveles productivos nacionales.

Asimismo, la implementación de herramientas moleculares pondrían un horizonte en el destino que se le va a dar a los animales que salen de nuestros rebaños, bien sea para centros de cría o para matadero, independientemente del enfoque empleado hasta ahora en los planes de mejoramiento genético, para que no sean considerados sólo como productos vendibles, sin tomar en cuenta su impacto en la salud pública y animal.

Muy a pesar de los costos que puedan generarse al realizar un genotipado, hay que colocar en contraparte los beneficios obtenidos; incluso el análisis molecular no tendría que ser masivo, implementándose principalmente en toros que se piensan utilizar masivamente para inseminación artificial o aquellos que son vendidos en centros genéticos. Igualmente, sería posible establecer una Certificación Molecular, que refleje no solo el genotipo del individuo para características económicas, sino también una batería amplia de pruebas moleculares que indiquen que está libre de enfermedades infecciosas o hereditarias conocidas para ese genotipo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed N, Devi SM, Valverde M De L, Vijayachari P, Machangu RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 23: 5-28.
- Aranguren-Méndez J, Román-Bravo R, Villasmil-Ontiveros Y, Yáñez-Cuéllar L. 2007. Evaluación genética de la ganadería mestiza doble propósito en Venezuela. *Arch Latinoam Prod Anim.* 15 (Supl. 1): 241-250.
- Aranguren-Méndez JA, Ruíz J, Portillo M, Rojas I, Flores C, Méndez K. 2010. Polimorfismo genético de los genes de calpaína y calpastatina en un rebaño Brahman en Venezuela. *Mem XV Cong Venez Prod Ind Anim.* Barquisimeto, Venezuela. Septiembre.
- Aranguren-Méndez JA, Portillo MG, Yáñez LF, Rincón X, Contreras G, Villasmil-Ontiveros Y. 2011. Caracterización genética del ganado Criollo Limonero a través de genes de interés productivo. *AICA* 1: 199-202.
- Barendse WJ. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application No. PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- Boichard D, Fritz S, Rossignol MN, Boscher A Malafosse, Colleau JJ. 2006. Implementation of marker-assisted selection in French dairy cattle. *Proc. 8th World Cong Genet Appl Livest Prod, Commun.* 2-11. Instituto Prociencia, Belo Horizonte, Brazil.
- Cañón J. 2006. Utilización de información molecular en programas de mejoramiento animal. *Rev Corpoica.* 7 (1): 5-15.
- Dekkers JC. 2004. Commercial application of marker and gene assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J Anim Sci.* 82 (E-Suppl.): E313-E328.
- Dekkers JC. 2007. Prediction of response to marker-assisted and genomic selection using selection index theory. *J Anim Breed Genet.* 124: 331-341.
- Echeverri J, López-Herrera A, Rincón J. 2011. Inclusión de los marcadores moleculares para algunos genes de importancia económica en la evaluación genética de toros y vacas lecheras en Colombia. *AICA* 1: 430-433.
- Gravekamp C, Van De Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 139: 1691-1700.
- Harlizius B, Schröder S, Tammen I, Simon T. 1996. Isolation of the bovine uridine monophosphate synthase gene to identify the molecular basis of DUMPS in cattle. *J Anim Breed Genet.* 113 (1-6): 303-309.
- Hayes B. 2007. QTL Mapping MAS and genomic selection. Department of primary industries. Victoria, Australia pp 116.
- Imaoka K, Kimura M, Suzuki M, Kamiyama T, Yamada A. 2007. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn J Infect Dis.* 60 (2-3): 137-139.
- Kanae Y, Endoh D, Nagahata H, Hayashi M. 2005. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction primer introduced restriction analysis. *J Vet Diagn Invest.* 17: 258-262.
- López-Zavala R, Cano-Camacho H, Chassin-Noria O, Zavala-Páramo MG. 2007. Selección asistida por marcadores genéticos moleculares en especies animales de interés pecuario. *Ciencia Nicolaita.* 46: 43-56.
- Meuwissen THE, Goddard ME. 1996. The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. *Genet Sel Evol.* 28: 161-176.

- Padeeri M, Vijaykumar K, Grupe S, Narayan MP, Schwerin M, Kumar MH. 1999. Incidence of hereditary Citrullinaemia and bovine leukocyte adhesion deficiency syndrome in Indian dairy cattle (*Bos taurus*, *Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) population. Arch Tierz. 42: 347-352.
- Sangari FJ, Agüero J. 1994. Identification of Brucella abortus B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus. Vaccine. 12 (5): 435-438.
- Shome BR, Das Mitra S, Bhuvana M, Krithiga N, Velu D, Shome R, Isloor S, Barbuddhe Sb, Rahman H. 2011. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. J Appl Microbiol. 111 (6): 1349-1356.
- Shuster DE, Kehrli ME, Ackermann MR, Gilbert RO. 1992. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. Proc Natl Acad Sci USA. 89: 9225-9229.
- Tammen IH, Klippert A, Kuczka A, Treviranus J, Pohlenz M, Stober D, Simon D, Harlizius B. 1996. An improved DNA test for bovine leukocyte adhesion deficiency. Res Vet Sci. 60: 218-221.
- Thomsen B, Horn P, Panitz F, Bendixen E, Petersen AH, Holm L, Nielsen VH, Agerholm JS, Arnbjerg J, Bendixen C. 2006. A missense mutation in the bovine *SLC35A3* gene, encoding a UDP-N- acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. Genom Res. 16: 97-105.
- Van Eenennaam AL, Li J, Thallman RM, Quaas QL, Dikeman ME, Gill CA. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. J Anim Sci. 85: 891-900.
- Van Eenennaam AL, Van der Werf JHJ, Goddard ME. 2011. The value of using DNA markers for beef bull selection in the seedstock sector. J Anim Sci 89: 307-320.
- Van der Werf JH, Marshal K. 2003. Combining gene-based methods and reproductive technologies to enhance genetic improvement of livestock in developing countries. TO-PIC: Gene-based technologies applied to livestock genetics and breeding. IAEA International Atomic Energy Agency, Vienna (Austria); FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations 183: 24-25.
- Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM. 1999. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of Brucella abortus vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other Brucella species and strains. Clinic Diag Lab Immunol 6 (5): 760-764.
- Weinstock D, Bhudevi B, Castro A. 2001. Single tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled bovine serum. J Clin Microbiol 343-346.