Santiago, agosto 12 del 2005

Señor
Fernando Peña Royo
Jefe Dpto. Secretaria General
Fondo de Mejoramiento del Patrimonio Sanitario
Servicio Agrícola y Ganadero
PRESENTE

De nuestra consideración:

Adjunto sírvase encontrar el informe completo del proyecto durante el período de cuatro años " Establecimiento de Base de Datos Utilizando Marcadores Genéticos ADN, para Apoyar la Conservación de Especies y Razas Ganaderas Domésticas en Chile".
La referida presentación ha sido efectuada de acuerdo a lo dispuesto por las Bases Generales del Concurso.
Este informe reúne todos los antecedentes necesarios para formar un Laboratorio de ADN y es un manual para la práctica de ADN en Caballos, Caprino y Bovinos.

Sin otro particular, saluda atentamente a usted,

C/copia.Sra.Ana María Roca Jimeno, Secretaria Ejecutiva Fondo SAG

XIMENA GAROFALO PASSALACQUA
Coordinadora del Proyecto

RENDICIÓN TÉCNICA DEL PROYECTO

"Establecimiento de Base de Datos Utilizando Marcadores Genéticos en ADN, para Apoyar la Conservación de las Razas Ganaderas Domésticas en Chile".

Código 52-14-4000

Informe Final

Período Enero de 2001 a Diciembre de 2004

Laboratorio de ADN

Sociedad Nacional de Agricultura

INDICE

Marco Teórico	3
Objetivos del trabajo	13
Metodología	14
Resultados	23
Conclusiones	28
Bibliografía	42
Anexo 1: Protocolo: extracción ADN con resina chelex 5%	44
Anexo 2: Protocolo de extracción de ADN por columnas con silica (Genomed)	45
Anexo 3 protocolo concentración de muestras por columnas MICROCON	46
Anexo 4: Protocolo de amplificación de marcadores equinos con el kit "stockmarcks ® for horse equine genotyping kit 12 plex" (Applied Biosystems).	47
Anexo 5: Protocolo de amplificación de marcadores equinos con el kit "stockmarcks ® for horse equine genotyping kit 17 plex" (Applied Biosystems).	49
Anexo 6: Protocolo de amplificación de marcadores bovinos con el kit "stockmarcks cattle ® bovine genotyping kit 11 plex" (Applied Biosystems).	50
Anexo 7: Protocolo de amplificación de marcadores caprinos.	51
Anexo 8: Condiciones de electroforesis equipo ABI 310 para marcadores equinos bovinos y caprinos.	52
Anexo 9: Denaturación de las muestras y preparación para la electroforesis	53
Anexo 10: Frecuencias alélicas de 12 marcadores equinos.	55
Anexo 11: Frecuencias alélicas de 11 marcadores bovinos.	61
Anexo 12: Frecuencias alélicas de 6 marcadores caprinos.	67
Anexo 13: Electroferogramas Caprinos, Bovinos y Equinos.	70
Anexo 14: Certificado de Perfil de ADN y de Paternidad.	73
Anexo 15: Software Administrativo de Registro Genealógico.	75

MARCO TEORICO

El análisis filogénico y de paternidad se presenta en la actualidad como un instrumento con alto potencial de desarrollo. Más aún en áreas de trabajo como el sector pecuario, escasamente explotado en este sentido.

A continuación se presenta un análisis detallado de la rama de las Ciencias Biológicas que permite la utilización de este tipo de recursos, la Genética, evolución de ésta desde sus inicios hasta la actualidad, las herramientas técnicas más ampliamente utilizadas, la colaboración de otras disciplinas como la Bioestadística a esta ciencia y un panorama completo de las especies ganaderas involucradas en este estudio.

Genética

La continuidad y la variación en las características de los seres vivos son los temas centrales de la Genética. Desde antiguo se ha observado que algunas características de un individuo reaparecen en sus descendientes. Esta constancia de los seres vivos, o continuidad genética, es paralela a la variación que se observa también entre un organismo y otro. Obviamente, continuidad y variación, propiedades aparentemente contradictorias de la vida, son dos aspectos complementarios de la herencia de un material genético usualmente estable, pero que a veces cambia.

El estudio de la herencia se transformó en la ciencia de la Genética a partir de los trabajos de Gregorio Mendel. Inicialmente, estas investigaciones estaban dirigidas al problema de la variación entre las especies, para posteriormente concentrarse en los resultados de los cruzamientos con arvejas de la especie *Pisum sativum*.

Pero, para entender de mejor manera estos conceptos, se debe comprender a cabalidad su base bioquímica subyacente, inspirada, por cierto, en los ácidos nucléicos ADN y ARN.

Los ácidos nucleicos están constituidos por largas cadenas de residuos químicos compuestos de una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato de alta energía. Este compuesto se denomina nucleótido. Las bases nitrogenadas pueden ser de naturaleza púrica, como la Adenina (A) y la Guanina (G) ó bien pirimídica, como en el caso de la Citosina (C), Timina (T) y Uracilo (U).

Los nucleótidos se unen entre sí para formar ácidos nucleicos a través de enlaces fosfodiéster entre los carbonos 3' y 5' de los azúcares de los nucleótidos vecinos. Por su parte, los grupos fosfato aportan la estructura de soporte mediante la cuál los restantes integrantes nucleotídicos forman la estructura del ácido.

En general el DNA está constituido por dos cadenas antiparalelas, es decir, mientras una de ellas se orienta en sentido 3' a 5', la otra lo hace en sentido inverso, de 3' a 5'. Ambas cadenas se mantienen unidas por medio de enlaces químicos adecuados que soportan uniones entre bases nitrogenadas correspondientes: Adenina se une con Timina y Guanina se une con Citosina. Los enlaces que proporcionan estas uniones se denominan puente de hidrógeno y forman uniones denominadas pares de bases (pb), utilizadas frecuentemente para cuantificar la extensión de una secuencia dada.

La forma, estructura y orientación del DNA hace que éste adopte la conformación de una doble hélice con un giro determinado, que en la mayoría de las especies es hacia la derecha.

Cabe destacar que existe un concepto que es importante definir ya que será utilizado con regularidad a lo largo de este informe. Un alelo corresponde a cualquier variante genética perteneciente a un locus o lugar físico en un cromosoma determinado, que permite ser cuantificada fenotípica o genotípicamente.

Genética de poblaciones

Esta rama de la Genética pretende encontrar las regularidades y variaciones en los procesos de cambio de la estructura genética de las poblaciones de seres vivos. El término "estructura genética" corresponde a la distribución del material hereditario en un conjunto de individuos al considerar todas las posibles interacciones entre ellos y con el medio.

Las variables más usadas mediante las cuáles se describen los estados del sistema cuyas regularidades interesa investigar, son los parámetros que describen la distribución genética. Ejemplo de ello son los llamados cálculos de frecuencias fenotípicas, genotípicas y alélicas. Dentro de los cálculos de frecuencias, la frecuencia alélica se alza como una de las herramientas con mayor poder en el estudio de la genética poblacional, ya que da cuenta de la distribución de determinada (s) variante (s) en una población dada. Íntimamente ligado a este concepto se encuentra el término polimorfismo. Este término se refiere a la variabilidad existente dentro de una población. Primeramente se consideró sólo rasgos

variables de orden fenotípico, sin considerar su base genética. A principios de la década del cuarenta, se llegó a definir polimorfismo de manera compleja y poco cercana a los fenómenos que realmente ocurrían.

En la actualidad, y considerando sólo aspectos genéticos para la definición del término polimorfismo, se ha acuñado la siguiente generalidad: "polimorfismo, es toda aquella variación genética o de secuencia en un sistema que al menos debe poseer dos alelos, tal que la frecuencia de presentación del alelo minoritariamente representado sea de al menos un 1 %"

Estudio del ADN

Recientemente, se ha secuenciado casi la totalidad del genoma de algunas especies pluricelulares eucariontes de importancia en distintos aspectos. Producto de ello se ha concluido que, pese a la gran cantidad de material genético disponible dentro de los superenrollamientos característicos de los cromosomas, la totalidad del material traducido a algún producto proteico, es decir el ADN "codificante", no superaría el 10 a 15 % del total. De esto se desprende que existe una gran cantidad de ADN "no codificante" que aparentemente no entregaría ninguna información de relevancia para su estudio.

Hoy, se sabe que este ADN "chatarra" realmente juega un papel muy importante dentro de la regulación e integración del genoma en su conjunto, además de poseer ciertas regiones o secuencias, junto al ADN codificante, claves para la genotipificación, filiación y seguimiento inter e intraespecies.

Dentro de estas regiones, que en su conjunto suman aproximadamente 15 a 20 familias distintas, destacan:

- Regiones o loci (multialélicos) VNTR, también llamadas minisatélites que consisten en secuencias de 10 a 12 pares de bases (pb) hasta 100 a 200 pb de ADN repetidas en tándem, es decir, una tras otra, y que presentan un alto grado de variabilidad en su secuencia.
- Regiones o loci (multialélicos) STR, también llamadas microsatélites que consisten en secuencias de 2 hasta 6 a 8 pb de ADN repetidas en tándem, que poseen un alto

grado de variación en su secuencia y que tendrían un mayor poder discriminatorio en casos de filiación o paternidad.

- Nucleótidos SNP, que consisten en nucleótidos únicos que varían de un individuo a otro y que podrían determinar variaciones importantes si se sitúan en regiones vitales para el control génico. Este tipo de variantes se encuentra todavía en fase de estudio.
- Transposones, también llamado ADN móvil, que consisten en secuencias que "saltan" o cambian de posición dentro del genoma y que también aportan a la gran variabilidad presente de un individuo a otro.

Bioestadística: algunos conceptos importantes

Cuando coloquialmente se habla de estadística, se suele pensar en una relación de datos numéricos presentada de forma ordenada y sistemática. Esta idea es la consecuencia del concepto popular que existe sobre el término y que cada vez está más extendido debido a la influencia de nuestro entorno, ya que hoy día es casi imposible que cualquier medio de difusión no nos aborde diariamente con cualquier tipo de información estadística sobre accidentes de tránsito, índices de crecimiento de población, turismo, tendencias políticas, etc.

Sólo cuando nos adentramos en un mundo más específico como es el campo de la investigación de las Ciencias Sociales: Medicina, Biología, Psicología, empezamos a percibir que la Estadística no sólo es algo más, sino que se convierte en la única herramienta que, hoy por hoy, permite dar luz y obtener resultados, y por tanto beneficios, en cualquier tipo de estudio, cuyos movimientos y relaciones, por su variabilidad intrínseca, no puedan ser abordadas desde la perspectiva de las leyes determinísticas. Podríamos, desde un punto de vista más amplio, definir la estadística como la ciencia que estudia cómo debe emplearse la información y cómo dar una guía de acción en situaciones prácticas que entrañan incertidumbre.

La Estadística se ocupa de los métodos y procedimientos para recoger, clasificar, resumir, hallar regularidades y analizar los datos, siempre y cuando la variabilidad e incertidumbre sea una causa intrínseca de los mismos; así como de realizar inferencias a partir de ellos, con la finalidad de ayudar a la toma de decisiones y en su caso formular predicciones.

Existen algunos conceptos utilizados en bioestadística aplicada a la genética que suelen ser fundamentales para la estimación de la verosimilitud de las relaciones entre los individuos con referencia a marcadores específicos del ADN. Entre ellos están:

Cálculo de frecuencia génica o alélica: Se define como el cociente entre el conteo directo de los alelos tipificados en la determinación y la totalidad de cromosomas estudiados, considerando el hecho que cualquier locus polimórfico que se estudie debe poseer sólo dos variantes alélicas, cualesquiera que estas sean. Por ejemplo:

Nº de alelos contados: 20
Nº total de cromosomas estudiados: 100 (es decir, 50 individuos. 50 X 2 = 100)
Frecuencia alélica: 20 / 100 = 0.20

Cálculo de frecuencia fenotípica: Se define como el cociente entre los rasgos fenotípicos estudiados (color de pelo, altura, color de ojos) y la totalidad de individuos estudiados para ese caracter. Por ejemplo:

Nº de fenotipos contabilizados: 15
Nº de individuos estudiados: 100
Frecuencia fenotípica: 15 / 100 = 0.15

Cálculo de frecuencia genotípica: Se define como el cociente entre los distintos genotipos estudiados (es decir características determinadas genéticamente) y la totalidad de los individuos presentes en el estudio. En este punto es importante considerar que si los alelos del sistema estudiado se comportan con relación de codominancia entre ellos (es decir, ninguna variante predomina sobre la otra sino que las dos se "expresan" en el genotipo), el resultado del cálculo de la frecuencia genotípica es numéricamente igual al cálculo de la frecuencia fenotípica.

Cálculo de probabilidad de exclusión a priori: Se define como la probabilidad de exclusión de un individuo como padre en un análisis de paternidad. Este valor depende del

número de alelos estudiados y de la distribución de las frecuencias alélicas. Es un valor porcentual que es función directa del grado de polimorfismo de un sistema. Cuanto más polimórfico sea éste y más equilibradas estén las frecuencias de sus alelos, tanto mayor será la probabilidad de exclusión, lo que le hace ser un parámetro de gran valor médico-legal, específicamente en determinaciones biológicas de paternidad.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, constituye una herramienta de alto poder en el campo de los estudios en biología molecular. Consiste básicamente en la amplificación o generación de copias selectiva de un segmento de ADN específico a partir de secuencias iniciadoras que flanquean a la secuencia de interés por medio de una enzima polimerasa.

Desde comienzos de la década del noventa ha comenzado a utilizarse masiva y rutinariamente para obtener cantidades suficientes de material genético para su posterior análisis.

El principio teórico que subyace la PCR es simple. A partir de una fuente conocida de material genético que puede ser muy pobre en células nucleadas (que son las células que se utilizan para la extracción del ADN) se recoge una muestra de este material. Paralelamente a esto se confecciona una reacción que incluye ciertos reactivos químicos indispensables para el funcionamiento de la técnica. Esta contiene Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) en una concentración dada que actúa como cofactor de la enzima que polimeriza el ADN; una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) que conforman el "esqueleto" de la cadena de ADN naciente; un par de oligonucleótidos partidores que flanquean la secuencia de interés que se quiere amplificar; una enzima Taq DNA polimerasa que es la encargada de polimerizar o construir los fragmentos de ADN nuevos; agua como medio de soporte de la reacción y, lo más importante, la fuente de ADN nativo a partir de la cuál se generarán miles de millones de copias fieles del segmento que se escogió para amplificar.

Luego de un proceso de constitución de las reacciones adecuadas, éstas se someten a ciclos sucesivos de calor y enfriamiento en cortos períodos de tiempo, de manera tal que las cadenas de ADN se "abran" y permitan la entrada de la polimerasa y los demás reactivos

para comenzar con la generación de fragmentos de amplificación específicos a partir de la secuencia original.

De esta forma, al cabo de una cierta cantidad de ciclos calor-enfriamiento (que por lo general no superan los 35) se obtiene una cantidad más que considerable de fragmentos de ADN específicos para poder realizar una serie de análisis más complejos. De hecho, teóricamente se ha establecido un concepto matemático que resume la cantidad aproximada de copias obtenidas a través de una PCR estándar:

$$2^n$$

donde:

2 equivale al número de cadenas de ADN presentes al inicio de la reacción y que provienen del ADN nativo; y

n, que corresponde al número de ciclos empleados en la reacción.

Por lo tanto,

$$2^{35} = \text{n° de copias obtenidas al final de la PCR.}$$

Cómo puede observarse, a partir de una molécula bicatenaria única de ADN es posible obtener gran cantidad de copias de fragmentos específicos con un alto grado de confiabilidad. Ciertamente, a todas luces aparece como una alternativa inmejorable para los estudios en genética molecular. Pero es importante destacar que esta técnica, así como otras más recientes en este campo, no están exentas de problemas y complicaciones que deben ser resueltas sólo por la capacidad del investigador que la realiza.

El avance de las Ciencias Biológicas sin duda ha contribuido de manera significativa a la búsqueda permanente de los orígenes del hombre y de las especies ganaderas que los han acompañado en este proceso evolutivo. Ciertamente además, es de creciente interés científico mantener puras las razas consideradas endémicas de Chile, elevando su potencial reproductor, patrimonio genético y valor patrimonial.

Es por tanto fundamental conocer la importancia de estas especies, dando cumplimiento fiel a los anhelos de una cantidad importante de personas ligadas a la actividad pecuaria.

Importancia del caballo chileno

Los orígenes del caballo chileno se remontan al año 1540, cuando el conquistador Pedro de Valdivia introduce ejemplares desde el virreinato del Perú, población inicial que también que se incrementa con animales traídos desde el virreinato de la plata,

El caballo introducido por el español, demostró gran capacidad de adaptación a las condiciones geográficas y climáticas del territorio nacional, aumentando con ello el numero de criaderos, concentrándose especialmente en las zonas actuales del Aconcagua, Santiago y Colchagua principalmente.

Con el correr de los años fueron fijándose características morfológicas que definen al actual caballo chileno, explicadas por una parte, por la selección ejercida por las condiciones del relieve montañoso que presenta Chile, y por otro lado su uso en la recolección del ganado para su selección y marcaje.

Con la finalidad de resguardar y asegurar las características morfológicas del caballo chileno en 1893, es inaugurado oficialmente el registro genealógico, que convierte al caballo chileno en la raza con registro mas antigua de Sudamérica.

Como en Chile y en muchos lugares del mundo, el caballo ha sido un animal de trabajo. Primero fue usado por los conquistadores españoles para la guerra y para la agricultura. Cuando Chile consiguió su independencia, el caballo ya era un compañero indispensable y de uso diario; en la guerra, el trabajo agrícola y para el transporte. El Corralero chileno tiene sus mayores lazos con el uso para el arreo del ganado lo que derivó en su actual uso en el rodeo chileno.

Actualmente, debido a la accidentada geografía chilena, el caballo chileno se presenta como una herramienta necesaria para la movilización del ganado en quebradas, montañas, utilizándose especialmente en las veranadas (movimiento del ganado, a zonas con mejores praderas en épocas de verano). El interés del caballo chileno ha sobrepasado el mercado

interno, ya que criadores de caballos criollos argentinos y brasileños lo adquieren para generar productos mejorados a través de su cruza con el caballo chileno.

Las características anteriormente descritas del caballo chileno, permiten considerarlo como parte del patrimonio genético, de Chile, es por ello la preocupación que existe para llevar una adecuado registro genealógico respaldado principalmente por la prueba del ADN.

Importancia del ganado bovino:

Chile presenta una masa ganadera de aproximadamente 4 millones de cabezas, distribuidas principalmente en sus zonas centro y sur. El ganado vacuno es utilizado principalmente para las producciones de leche y la producción de carne, existiendo para esto, razas de producción de carne , leche y doble propósito.

Chile puede considerarse como uno de los países con mejor sanidad animal del mundo. Es libre de fiebre aftosa (FA) y encefalopatía espongiforme bovina (EEB), enfermedades de declaración obligatoria según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Con las nuevas políticas comerciales, orientadas a la incorporación a un mercado globalizado, surge el concepto de trazabilidad o rastreabilidad, como componente fundamental de los mecanismos de garantía sanitaria, es la capacidad de mantener identificados los animales, o sus productos, a lo largo de las cadenas de producción, comercialización y transformación hasta su origen, con el fin de realizar investigaciones epidemiológicas o establecer acciones correctivas en beneficio de la comunidad consumidora.

La trazabilidad sanitaria para bovinos brinda apoyo a los programas sanitarios actuales y mejora las garantías sobre seguridad sanitaria de los productos cárnicos producidos en el país. Como requisito fundamental en todo sistema de trazabilidad es necesario contar con un método de identificación que permita el rastreo del producto en toda la cadena productiva, es en esto donde la identificación por ADN, es fundamental para llevar a cabo un sistema de trazabilidad molecular.

La trazabilidad molecular nace como consecuencia de las exigencias de los consumidores como consecuencia de eventos de riesgo en salud animal, como por ejemplo el síndrome espongiforme bovino (Vaca loca) en Europa. La trazabilidad implica no solo la identificación de animales desde el nacimiento a la faena, sino también debe ser posible la identificación por parte del consumidor a través de un corte de carne vacuna, el origen e identificación del animal.

Importancia del ganado caprino.

La cabra es uno de los animales domésticos de más amplia distribución geográfica, debido a su extraordinaria capacidad de adaptación a diferentes condiciones de clima, vegetación y manejo.

La población de cabras esta mayoritariamente en manos de pequeños productores y cumple una importante función económica en las comunidades agrícolas y otras zonas de concentración de pobreza. En Chile el sistema de explotación es extensivo con una población de 1.134.516 cabezas (INE: Chile, 1982). La explotación caprina puede estar dirigida a la producción de leche y carne, sólo carne o leche y fibra.

A diferencia de los diversos sistemas de producción animal, como son el bovino, porcino, avícola, etc., el sistema de producción caprino no ha logrado obtener un adecuado desarrollo. Esto se debe, en gran parte, a un inapropiado manejo de la carga animal y a la casi inexistencia de un manejo del recurso pastizal, creando un ecosistema degradado. Sin embargo hoy en día existe un amplio interés por parte de algunos criadores en desarrollar sistemas de tipo intensivo, con proyecciones a mejorar las condiciones de manejo de esta especie y con ello mejorar los niveles producción.

Un sistema de filiación e identificación por ADN en la especie caprina permite mantener una adecuada seguridad alimentaría, un correcto sistema de certificación de procesos de producción, formación de bases de datos, control de abigeato, mejoramiento genético, seguimiento epidemiológico de enfermedades, certificación de denominación de origen, relaciones de filiación y sustitución de marcas.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

A.- General

Lograr el mejoramiento de la condición del recurso genético animal, con la ayuda de una base de datos de ADN.

B.- Específicos

1.- Diseño e implementación de un laboratorio para el análisis de microsatélites en los recursos genéticos naturales. Implementación de la técnica para el análisis.

2.- Diseñar e implementación de una base de datos de ADN, para 12 marcadores genéticos en el Caballo Criollo Chileno.

3.- Generar un estudio poblacional con las frecuencias alélicas de 12 marcadores genéticos en el Caballo Criollo Chileno. Se emitirá un certificado de ADN para asegurar el mejoramiento y conservación de estos recursos.

4.- Generar un estudio poblacional con las frecuencias alélicas de algunos marcadores genéticos en ganado caprino y vacuno.

METODOLOGÍA

A) RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

El ADN esta presente en los núcleos de cada una de las células que conforman un ser vivo. Por esta razón, cualquier muestra de tejido o fluído biológico que contenga células nucleadas tendrá ADN.

Para la elección de la muestra con que se trabajaría en el laboratorio fue necesario considerar algunos aspectos importantes:

_ Facilidad de obtener y transportar la muestra. La Toma de la muestra no se realiza en el laboratorio, si no que en los criaderos o donde se encuentren los animales por lo que el tipo de muestra a elegir debe ser fácil de obtener y transportar hacia el laboratorio.

_ Rendimiento de la muestra. No todas las muestras tienen la misma cantidad de ADN, ya que depende de cuantas células nucleadas contenga el tejido o fluido en estudio. Por lo que al elegir la muestra hay que saber cual va a ser el rendimiento de esta.

_ Obtención de ADN. Es importante saber el grado de complejidad en la obtención de ADN de la muestra elegida. Esta característica esta dada principalmente por la naturaleza de la muestra (no es lo mismo obtener ADN de un hueso que de una gota de sangre), como por la presencia de inhibidores que puedan ser difíciles de eliminar.

_Conservación y almacenamiento de la muestra. Es importante conocer las características de la muestra a obtener, cual es su viabilidad y en que condiciones de almacenamiento durara mas tiempo integra.

Considerando todos estos aspectos se opto por obtener el ADN a partir de muestras de folículos pilosos, específicamente de la raíz de ellos.

La obtención de la muestra esta a cargo de Inspectores pertenecientes a la Sociedad Nacional de Agricultura que actúan como ministros de Fe, certificando que la muestra obtenida es del animal correcto.

Para los ejemplares equinos las muestras son obtenidas de la tusa o la cola., en el caso de los Bovinos desde el lomo y de los Caprinos de la grupa.

Es importante que la muestra se obtenga arrancando los pelos desde la raíz, y no cortándolos, ya que es precisamente en la raíz donde se encuentra el ADN.
Los pelos son transportados al laboratorio en bolsas plásticas con cierre hermetico y se rotulan con los datos del animal en estudio. En el laboratorio se les asigna un numero de trabajo y se almacenan a –20° C hasta el momento en que se trabajen.

B) EXTRACCIÓN DE DNA.

Para obtener el ADN desde la raíz de los pelos es necesario en primera instancia, destruir esta raíz para liberar el ADN que esta en las células. Esto se realiza mediante un proceso denominado Digestión Enzimática. Para ello se utiliza una enzima denominada Proteinasa K, la cual se agrega a la muestra junto con alguna soluciones detergentes y se incuba por un período de tiempo a 56° C. Luego de este periodo las raíces se han disuelto y el ADN se encuentra en la fase acuosa.
En un principio se utilizo un protocolo de extracción de DNA por una resina de intercambio ionico denominada Chelex. Esencialmente lo que hace esta resina es atrapar todas las sustancias que están en la fase acuosa, dejando solo el ADN, por lo que rápidamente se obtenía ADN para analizar. El inconveniente con esta técnica fue que la cantidad de ADN que se lograba purificar era muy poca por lo que en muchas ocasiones no se obtenían resultados satisfactorios. Esto se agravó mucho mas cuando, debido a un cambio en la presentación del KIT de Genotipificación en Caballos, la exigencia en cuanto a calidad y cantidad de ADN aumentó, por lo que el porcentaje de resultados insatisfactorios se incrementó considerablemente.
Por esta razón se cambió el procedimiento de extracción a Columnas de Silica. La silica es un adsorbente que tiene la capacidad de atrapar ADN, y luego liberarlo. En general el protocolo consiste en agregar al ADN silica para que se una a el, limpiar este ADN de cualquier contaminante o inhibidor que tenga la muestra y posteriormente eluir el ADN.
Para realizar este procedimiento se utilizó el Kit comercia "JET QUICK TISSUE" de la marca GENOMED.

Los protocolos de Extracción de ADN por medio de Chelex y por columnas de silica se encuentran descritos en los anexos 1 y 2.

C) AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES GENETICOS.

Lugo de la obtención del ADN es necesario multiplicar (amplificar) las zonas donde se encuentran los Marcadores en proceso denominado PCR (Polimerase Chain Reaction). Para ellos se requieren ciertos trozos de ADN llamados Cebadores o partidores los que se unirán a zonas especificas del ADN que estamos estudiando y harán muchas copias de esas zonas. Lo principal es que la composición de estos partidores sea especifica de tal forma que solo amplifique la zona del ADN que se desea estudiar.

Para la amplificación de los marcadores genéticos en Equinos se utilizó el Kit Comercial "StockMarcks ® for horse Equine Genotyping Kit" de la marca Applied Biosystems.
Los partidores que se utilizan en esta técnica deben estar marcados de tal forma que se pueda visualizar el fragmento una vez amplificados los alelos en estudio. La marcación se realiza mediante fluorocromos, que son moléculas capaces de generar señales al ser excitadas por un láser. Esta señal va a ser de distintos colores dependiendo del fluorocromo con que se haya marcado el partidor.

En un principio la presentación del Kit traía partidores para la amplificación de 12 marcadores equinos, y consistía en 2 reacciones, una octuplex (8 pares de partidores) y una cuadruplex (4 pares de partidores) las que se trabajaban por separado hasta el momento en que se procesaban en el Analizador genético.

El detalle de los Partidores que tenía este Kit es el siguiente:

Marcador	Fluorocromo	Color	Rango (Pares de base)
VHL20	6-FAM™	Azul	83-105
HTG4	6-FAM™	Azul	116-117
ATH4	6-FAM™	Azul	140-166
HMS7	6-FAM™	Azul	167-187
HTG6	JOE™	Verde	74-102
AHT5	JOE™	Verde	126-148
HMS6	JOE™	Verde	155-169
ASB2	JOE™	Verde	238-268
HTG10	NED	Amarillo	83-111
HTG7	NED	Amarillo	114-128
HMS3	NED	Amarillo	146-174
HMS2	NED	Amarillo	216-248

Posteriormente la presentación de Kit cambió, agregándosele 5 pares nuevos de partidores para totalizar 17 marcadores a estudiar. El otro cambio que incorporaba este kit es que todos los Primer se trabajan en una sola reacción. Además se reemplazó el fluorocromo JOE™ por el fluorocromo VIC (verde) y el fluorocromo NED por TAMRA (Amarillo).
El detalle de los nuevos partidores que tiene esta presentación del Kit es el siguiente:

Marcador	Fluorocromo	Color	Rango (Pares de base)
ASB23	VIC	Verde	176-212
ASB17	PET	Rojo	104-116
LEX3	PET	Rojo	137-161
HMS1	PET	Rojo	166-178
CA425	PET	Rojo	224-248

Los protocolos de ambas amplificaciones se encuentra detallados en los anexos 4 y 5.

Para la amplificación de los marcadores genéticos en Bovinos se utilizó el Kit Comercial "StockMarcks for Cattle ® Bovine Genotyping Kit" de la marca Applied Biosystems.
Este Kit esta desarrollado para a amplificación de 11 marcadores Bovinos en una sola reacción.
El detalle de los nuevos partidores que tiene esta presentación del Kit es el siguiente:

Marcador	Fluorocromo	Color	Rango (Pares de base)
TGLA227	6-FAM™	Azul	65-115
BM2113	6-FAM™	Azul	116-146
TGLA53	6-FAM™	Azul	147-197
ETH10	6-FAM™	Azul	198-234
SPS115	6-FAM™	Azul	235-265
TGLA126	JOE™	Verde	104-132
TGLA122	JOE™	Verde	134-192
INRA23	JOE™	Verde	193-235
ETH3	NED	Amarillo	90-132
ETH225	NED	Amarillo	134-165
BM1824	NED	Amarillo	170-218

El protocolo de Amplificación se encuentra en el anexo 6.

Para la amplificación de marcadores en Caprinos, no existe Kit comercial disponible. Por esta razón se debió sintetizar 6 marcadores genéticos de los 14 descritos por el ISAG (International Society for Animal Genetics) para la determinación de perfiles de ADN en caprinos. Los marcadores que se estudiaron fueron los siguientes: SRCRSP24, SRCRSP8, INRA5, SRCRSP5, TGLA53 y ETH10.

Las secuencias de los partidores son las siguientes:

Marcador	Sentido	Secuencia
SRCRSP24	forward	5'-AGC AAG AAG TGT CCA CTG ACA G-3'
	Reverse	5'-TCT AGG TCC ATC TGT GTT ATT GC-3'
SRCRSP8	forward	5'-TGC GGT CTG GTT CTG ATT TCA C-3'
	Reverse	5'-CCT GCA TGA GAA AGT CGA TGC TTA G-3'
INRA5	forward	5'-TTC AGG CAT ACC CTA CAC CAC ATC-3'
	Reverse	5'-AAA TAT TAG CCA ACT GAA AAC TGG G-3'
SRCRSP5	forward	5'-GGA CTC TAC CAA CTG AGC TAC AA-3'
	Reverse	5'-TGA AAT GAA GCT AAA GCA ATG C-3'
TGLA53	Forward	5'-CAG CAG ACA GCT GCA AGA GTT AGC-3'
	Reverse	5'-CTT TCA GAA ATA GTT TGC ATT CAT GCA-3'
ETH10	Forward	5'-GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA CA-3'
	Reverse	5'-CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC-3'

Estos partidores se marcaron con distintos fluorocromos, quedando el esquema de la siguiente manera:

Marcador	Fluorocromo	Color	Rango (Pares de base)
SRCRSP24	6-FAM™	Azul	139-163
SRCRSP8	TAMRA	Amarillo	212-240
INRA5	JOE™	Verde	**
SRCRSP5	TAMRA	Amarillo	162-182
TGLA53	6-FAM™	Azul	137-153
ETH10	TAMRA	Amarillo	204-212

** No hay rango descrito en la literatura.

Los protocolo de Amplificación se encuentran en el anexo 7.

D) RESOLUCIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Una vez amplificados los fragmentos de cada uno de los marcadores genéticos en las muestras trabajadas es necesario separarlos y visualizarlos.

Esto se realiza mediante un proceso denominado "Electroforesis". Este procedimiento se basa en el hecho que las moléculas de ADN tienen carga eléctrica negativa, por lo que al aplicar un campo eléctrico migrarán hacia el polo positivo. La velocidad de migración será directamente proporcional al tamaño de la molécula por lo que luego de un tiempo de aplicar este campo eléctrico, el desplazamiento será diferente entre moléculas de ADN con distinto tamaño.

Para realizar este procedimiento en nuestro laboratorio contamos con el Equipo ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER de la firma Applied Biosystems. Este equipo realiza una electroforesis a cada una de las muestras en forma individual y al cabo de un tiempo va midiendo la migración de cada uno de los fragmentos. La información que obtiene es transmitida a un computador, el cual la interpreta mediante software específicos.

Este proceso es una electroforesis capilar, es decir la muestra migra a través de un capilar con un lumen muy pequeño (50μm) y homogéneo, el cual tiene cerca de uno de sus extremos una ventana por donde incide un láser que va leyendo los resultados. Cada uno de los extremos del capilar esta en contacto con un electrodo, uno positivo y otro negativo. Dentro del capilar se encuentra un polimero conductor que sirve de soporte para que las moléculas de ADN migren a través de el.

Al generarse la carga eléctrica necesaria las moléculas de ADN van migrando a diferente velocidad de acuerdo a su tamaño por lo que llegarán en distintos tiempos a la ventana del capilar. Primero las moléculas de menos tamaño y luego las moléculas mas grandes.

Como los partidores están marcados con distintos fluorocromos estos van a generar diferentes señales, al excitarse con el láser, de acuerdo al color que tengan y al momento en que pasen por la ventana del capilar. Esta señal es recogida por un sensor del equipo (cámara de CCD), se procesa y se envía al computador para su posterior análisis.

Para que el equipo realice una correcta lectura es necesario conocer cuales son los colorantes con los que están marcadas las muestras para hacer los ajustes correspondientes, por lo que cada grupo de colorantes (fluorocromos) tiene un modulo particular de corrida

que es necesario ejecutar. El detalle de los módulos y las condiciones de corridas electroforética para cada una de las muestras analizadas se encuentran en el anexo 8.

Para que la muestra pueda correr por el capilar en forma homogénea deben estar separadas ambas hebras del ADN en un proceso denominado Denaturación. Esto se logra sometiendo la muestra a alta temperatura. Para evitar que ambas hebras de ADN se vuelvan a juntar se agrega un agente denaturante que las mantiene separadas, en este caso se agrega Formamida deionizada.

Además para poder calcular el tamaño de los fragmentos de ADN que estamos estudiando, es necesario agregar a cada muestra un Estándar de Peso Molecular con tamaños conocidos. Este Estándar debe estar marcado con otro fluorocromo para poder ser leído por el equipo.

El protocolo de denaturación y preparación de las muestras para la electroforésis de cada uno de los marcadores estudiados se encuentran en el anexo 9.

E) ANÁLISIS DE RESULTADOS

Una vez que los resultados son rescatados desde el equipo, deben ser analizados para poder identificar los distintos marcadores y sus respectivos alelos.

Para ello se utiliza el Software GeneScan 3.1.2 de Applied Biosystems. Este software es capaz de interpretar los datos obtenidos desde el analizador genético y transformarlos en un archivo que contiene una serie de gráficos donde se pueden separa cada uno de los colores para poder así identificar en forma individual todos los marcadores que se están analizando.

Para obtener un resultado óptimo se debe instalar una matriz adecuada que sea capaz de filtrar todos los colores y poder discriminar en forma independiente cada uno de ellos. Esta matriz debe ser construida para cada uno de los módulos de trabajo y reinstalada cada vez que se realice un cambio importante en el equipo, como cambio de láser, alineación de este, movimientos muy bruscos del equipo etc. La idea es que la matriz refleje de la mejor manera posible las condiciones en las cuales la muestra se esta procesando.

Una vez instalada la matriz en el archivo que contiene la corrida electroforética de la muestra se debe definir el Standard interno que corrió junto con la muestra para poder asignarle un tamaño especifico a cada señal detectada por el equipo, y que corresponde a un

fragmento de ADN determinado. Así obtenemos un detalle de cada uno de los fragmentos de la muestra analizada con su respectivo color y tamaño.

Para poder Imprimir estos resultados y saber a que marcador corresponde se utiliza el Software Genotyper 2.5 de Applied Biosystems el cual procesa los datos ya analizados y los separa marcador por marcador, facilitando su interpretación.

F) ELABORACIÓN DE INFORMES

Una vez que la información de cada uno de los marcadores esta impresa e un formato de análisis denominado eletroferograma se comparan los alelos de la cría con los presuntos progenitores. Para cada uno de los marcadores existen 2 alelos, uno aportado por la madre y otro por el padre, por lo que si se cumple esta regla en todos los marcadores en estudio, se confirma la paternidad y maternidad de ambos. En caso contrario se excluye con aquel individuo que no comparta alelos.

Para verificar que la aceptación de la paternidad y maternidad es necesario descartar que los alelos compartidos entre los individuos sea producto de azar por lo que es necesario calcular el porcentaje de paternidad y maternidad. Este porcentaje se calcula según la ecuación de Essen-Möller la que considera la frecuencia poblacional de cada uno de los alelos en estudio para su calculo.

Esta probabilidad debe ser superior a 99.99% para ser aceptada valida la paternidad y maternidad.

En el caso de los Equinos los resultados obtenidos con el set de 12 marcadores son transcritos a letras del abecedario según el tamaño de los alelos. Cada alelo de cada marcador tendrá una letra asignada; la conversión de tamaño molecular a letra es regulada por el ISAG (International Society of Animal).

RESULTADOS

Implementación de un laboratorio de Biología Molecular.

El primer objetivo del presente proyecto fue el crear un laboratorio que contara con la infraestructura, el equipamiento y la idoneidad necesaria para trabajar en la determinación de perfiles genéticos en animales y análisis de filiación.

Durante el primer año de la ejecución del proyecto se acondicionaron dependencias de la Sociedad Nacional de Agricultura para la implementación de un laboratorio de ADN. Además se adquirió el equipamiento y el material básico para su funcionamiento.

A medida que el tiempo transcurría aumentaron las exigencias y necesidades del laboratorio por lo que se hizo necesario comprar nuevos equipos y materiales. Para ello se compró un refrigerador, un termociclador, una cámara de PCR y computadores entre otros equipos además de la ampliación de la planta física del laboratorio.

En cuanto al personal, en una primera etapa el laboratorio comenzó a operar con un solo profesional, quien estaba a cargo de todas las áreas del laboratorio (profesional, técnica y administrativa). Sin embargo debido a la creciente demanda de trabajo y a la complejidad de éste fue necesario dividir esas funciones y contratar mas personal. Al finalizar el periodo del presente proyecto el laboratorio cuenta con 3 profesionales, 2 técnicos y 1 secretaria.

Estandarización de las Técnicas para la obtención de perfiles genéticos en Equinos.

Para comenzar a trabajar en la obtención de perfiles genéticos en equinos fue necesario realizar la estandarización de las técnicas de extracción, amplificación y electroforesis de las muestras en estudio.

Para validar los resultados obtenidos por nuestro laboratorio se enviaron contra muestras al Laboratorio Genética y Tecnología en Santiago y a la Universidad de California en Estados

Unidos. En ambas instituciones se obtuvieron los mismos perfiles genéticos que los logrados en nuestro laboratorio lo que permitió validar los resultados.

Los protocolos de trabajo generados en esta primera etapa funcionaron sin mayores inconvenientes durante tres años. Sin embargo la empresa que fabrica el Kit para determinación de perfiles genéticos en equinos cambió su presentación y especificaciones técnicas. Por esta razón se debió elaborar nuevos protocolos de trabajo debido en gran parte a la mayor exigencia en calidad y cantidad de ADN que requería este nuevo Kit de determinación de Equinos.

Con estos nuevos protocolos de trabajo se mejoró en forma considerable la calidad de los perfiles genéticos obtenidos y se logro aumentar el numero de resultados. La cantidad de análisis de equinos realizados durante el periodo del proyecto superó ampliamente las expectativas, totalizando 12.400 muestras, un 70% más de lo esperado.

Fabricación de un Kit para determinación de perfiles genéticos en Equino.

Un aspecto importante que surgió durante el desarrollo del proyecto fue la idea de reemplazar el Kit comercial para la identificación de marcadores equinos por uno desarrollado en el laboratorio de la Sociedad Nacional de Agricultura.

Se sintetizaron en EEUU 24 oligonucleótidos (forward y reverse) para la determinación de 12 marcadores equinos (VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, HMS6, HTG7, HMS3, AHT5, ASB2, HTG10 y HMS2). En cada sistema alélico se marcó el oligonucleótido forward con una molécula fluorescente (FAM, JOE ó TAMRA), para poder analizarlos a través del secuenciador ABI PRISM 310.

Estos oligonucleótidos se probaron individualmente y funcionaron satisfactoriamente, pero no se logró obtener perfiles genéticos cuando se trabajaron en conjunto (reacción múltiplex). Se esta intentando generar un sistema de tres reacciones cada una con cuatro pares de oligonucleótidos para usarlo en reemplazo del Kit comercial. Al finalizar el

presente proyecto se han logrado obtener resultados muy satisfactorios en el primer multiplex, restando la estandarización de las otras dos mezclas de reacción.

Base de datos y sistema de ingreso de resultados.

Para poder almacenar la información de cada uno de los perfiles genéticos obtenidos de los animales en estudio con la finalidad de generar informes de éstos fue necesario elaborar un programa computacional que maneje e integre toda la base de datos que se genera a partir de los resultados del laboratorio y que la pueda administrar eficientemente.

El programa consta de las siguientes funciones:

_ Sistema de registro y manejo genealógico: En esta sección del programa se almacenan y administran todos los datos que tienen relación con la identificación y características del animal, su genealogía y descendencia, datos sobre su propietario y criadero, etc.

_ Sistema de Administración del laboratorio: En esta sección se manejan todos los antecedentes que tienen relación con el manejo de las muestras en el laboratorio, identificando y relacionando cada una de las muestras con su animal correspondiente, y detallando el estado del análisis, además de otros aspectos importantes en el manejo del laboratorio.

_ Sistema de Administración de Folios y pagos: Esta sección del programa maneja todos los antecedentes de las muestras que llegan al laboratorio y sus estados de cobranza, además de la información del solicitante.

_ Sistema de Informe de resultados: En esta sección se ingresan los perfiles genéticos de cada uno de los animales en estudio y en el caso de las crías la paternidad y maternidad.

Este programa fue elaborado para el manejo del registro genealógico del Caballo Criollo Chileno, pero se pretende usar el mismo modelo para el registro de caprinos y bovinos.

Estandarización de las Técnicas para la obtención de perfiles genéticos en Bovinos.

Se obtuvo muestra de 50 ejemplares Bovinos, todos correspondiente a hembras de la raza Holstein Frozen pertenecientes a una lechería de la Región Metropolitana.
Se siguió el mismo protocolo de trabajo que el usado en equinos, obteniéndose resultados satisfactorios, por lo que al finalizar el periodo del proyecto se logró una optima estandarización de la técnica.

Estandarización de las Técnicas para la obtención de perfiles genéticos en Caprinos.

Para la estandarización de esta técnica se obtuvo muestra de 50 ejemplares Caprinos. Estos ejemplares correspondían a machos, hembras y crías de la raza Saanen, de la Región Metropolitana.
Se trabajó cada uno de los 6 marcadores en forma individual y se fue ajustando la técnica hasta su estandarización final, lográndose la obtención de perfiles genéticos satisfactorios para todos los marcadores.

Cálculo de frecuencias alélicas en Caballo Chileno Criollo.

Con los perfiles genéticos obtenidos en los primeros 2000 individuos se calcularon las frecuencias alélicas de cada uno de los marcadores en estudio. Con estos datos se calculó la probabilidad de exclusión a priori que fue de 99,8 % para el sistema utilizado en nuestro laboratorio lo que es muy satisfactorio de acuerdo a estándares internacionales.
El detalle de las frecuencias alélicas para cada uno de los 12 marcadores equinos se encuentra en el anexo 10.

Cálculo de frecuencias alélicas en Bovinos.

Con los datos obtenidos de las 50 muestras analizadas se calcularon las frecuencias alélicas para cada uno de los 11 marcadores Bovinos en estudio. Estas frecuencias se encuentran detalladas en el Anexo 11.

Cálculo de frecuencias alélicas en Caprinos.

A partir de las 50 muestras analizadas se calcularon las frecuencias alélicas para cada uno de los 6 marcadores Caprinos en estudio. Estas frecuencias se encuentran detalladas en el Anexo 12.

CONCLUSIONES

Implementación de un laboratorio de Biología Molecular.

Inicialmente el diseño del laboratorio abarcó solo algunas salas del subterráneo del edificio de la Sociedad Nacional de Agricultura. Además se adquirió solo el equipamiento básico para su funcionamiento y un solo profesional debía hacerse cargo de las áreas administrativa, técnica y profesional.

Sin embargo la cantidad y complejidad del trabajo obligó a replantear el diseño e infraestructura del laboratorio. Estos cambios se tradujeron en tres aspectos:

1 -Ampliación de la planta física del laboratorio. En un principio se habilitaron 2 salas para el laboratorio mas una sala para la parte administrativa. Estas salas contaban con mesones de trabajo, piso y paredes lavables, muebles para almacenamiento, iluminación adecuada y otros requerimientos para el buen funcionamiento del laboratorio. Se destino una sala para el trabajo Pre PCR y la otra sala para el trabajo post PCR. La PCR se realizaba en la primera sala. La sala administrativa tenia escritorios y muebles y contaba con Red computacional. Posteriormente fue necesario habilitar otra sala mas para el laboratorio y designar una zona exclusiva para la PCR y destinar otra sala para las labores administrativas. De esta forma el laboratorio actualmente cuenta con 2 salas pre PCR (para corte de muestras, extracción y cuantificación de ADN), una zona exclusiva para PCR y una sala para Post PCR. Además cuenta con una zona Administrativa donde funciona la secretaría del laboratorio y una sala para los profesionales.

2- Adquisición de Equipos e Instrumentos. Lo primero que se adquirió en el laboratorio fue el material básico para su funcionamiento. Este material consistía principalmente en un Secuenciador Automático, un Termociclador, un juego de pipetas automáticas, un baño termoregulado, un transiluminador, una cámara de electroforesis horizontal, entre otros. Este material básico rápidamente se hizo insuficiente debido por un lado al creciente

aumento de la carga de trabajo y por otro a la necesidad de mantener separados los materiales de las áreas Pre y Post PCR. Es así como se compraron más juegos de pipetas, un congelador horizontal para el almacenamiento de las muestras, una cámara de PCR y otro termociclador con mayor capacidad, entre otros equipos.

3- Contratación de nuevo personal: Las labores administrativas, técnicas y profesionales que tenia a su cargo el profesional del laboratorio fueron incrementándose con el tiempo. Por esta razón fue necesario separar las labores y contratar nuevo personal. Al momento de finalizar el presente proyecto el personal del laboratorio esta constituido por 3 profesionales: un Medico Veterinario y dos Tecnólogos Médicos, uno de ellos a cargo de la Jefatura del laboratorio. Además la parte técnica esta compuesta de 2 técnicos químicos y la parte administrativa por una Secretaria Ejecutiva.

Luego de cuatro años de ejecución del proyecto se ha logrado formar un laboratorio de Biología Molecular con un gran potencial de crecimiento y desarrollo destinado a cubrir las necesidades de las diferentes especies que forman parte del sector ganadero de nuestro país.

Estandarización de las Técnicas para la obtención de perfiles genéticos en Equinos.

Una vez habilitadas las instalaciones para el funcionamiento del laboratorio y de adquirido el equipamiento básico, se comenzó a estandarizar los protocolos para la obtención de perfiles genéticos en equinos. Esta estandarización incluía los protocolos de obtención de la muestra, extracción de ADN, amplificación de los marcadores genéticos y corrida electroforética. Una vez estandarizado todos estos protocolos se logró obtener perfiles genéticos satisfactorios de todas las muestras analizadas.

Sin embargo fue necesario validar los resultados obtenidos por nuestro laboratorio por lo que se coordinó el envío de contra-muestras con dos instituciones con experiencia en Biología Molecular. Por un lado se enviaron muestras al laboratorio Genética y Tecnología Ltda. para su análisis. Por otro lado hubo envió de muestras desde la Universidad de

California hasta el laboratorio para su análisis. En ambos casos se confirmaron los resultados obtenidos por nuestro laboratorio.

A principios del tercer año de ejecución del proyecto, Applied Biosystems, empresa que fabrica el kit para la determinación de marcadores en equinos (StockMarks® For Horses), modificó el formato de éste aumentando el numero de marcadores (de 12 a 17) y generando una sola reacción (antes eran 2 reacciones, una octuplex y otra cuádruplex).

Debido a que este kit utiliza nuevos oligonucleótidos, nuevos fluorocromos y posee mas marcadores, implicó la re-estandarización de todas las etapas del proceso del análisis del ADN, así como la instalación de nuevos softwares para matriz y estándares de peso molecular.

El cambio de Kit ocurrió sin previo aviso y no dio espacio para hacer estudios comparativos entre los dos Kit, lo que provoco muchos problemas en el laboratorio, tanto en la estandarización de la técnica como en la homologación de los resultados.

Para solucionar estos inconvenientes se trabajó en 3 aspectos diferentes:

A) Tipo, cantidad y calidad de las muestra.

Se trabajo en 2 aspectos; por un lado buscar un tipo de muestra alternativo al pelo y por otro lado estandarizar la cantidad y calidad de pelo a utilizar en la extracción, así como la forma de almacenarlo.

La muestra biológica a elección del laboratorio ha sido la raíz de pelo, debido a que presenta menos dificultades para ser obtenidas en terreno y es de fácil manejo y traslado hacia el laboratorio. Si bien el pelo presenta esta gran ventaja con respecto a otras muestras, en el laboratorio genera muchas dificultades ya que por un lado el ADN nuclear se encuentra en su gran mayoría en el folículo piloso, el cual esta cubierto por una densa capa de queratina, que requiere ser destruida por digestión enzimática, y por otro lado la cantidad de ADN que posee es mucho menor si la comparamos con otro tipo de muestra. Por esta razón se buscó alguna alternativa de muestra, que mejore significativamente el rendimiento de la extracción, y que no presente grandes dificultades al momento de la toma

de muestra. Se tomaron 2 muestras de sangre impregnadas en papel FTA, se extrajeron por chelex (resina de intercambio iónico) y se amplificaron, logrando ver un perfil claro de ADN. Sin embargo la toma de muestra fue algo dificultosa por lo que antes de implementar un cambio en el tipo de muestra se hace necesario capacitar a los inspectores en la toma del espécimen y en el manejo de esta técnica.

En cuanto al manejo de pelos en la extracción, se aumento el número de raíces a cortar de 5 a 10, además de capacitar al personal técnico en la elección de las raíces a cortar y a la forma del corte (lo mas acotada posible para disminuir la cantidad de melanina que quede en la muestra ya que es un inhibidor de la PCR). Por otro lado las muestras nuevas que no se han procesado se han almacenando a –20° C para evitar la degradación del ADN.

B) Métodos alternativos de extracción y concentración de muestra

Hasta Septiembre de 2004 el proceso de extracción solo se realizaba por chelex (resina de intercambio iónico) previa digestión de la muestra con Proteinasa K. Si bien el chelex es muy utilizado en procesos de extracción de ADN cuando se tiene una cantidad limitada de muestra (por ejemplo en muestras forenses), tiene muy bajo rendimiento, ya que la cantidad de ADN que se obtiene es del orden de 1 ng/ul. Este método de extracción era el único que se realizaba, y si alguna muestra no amplificaba se realizaba una nueva extracción pero con el mismo método. Por esta razón a partir de Octubre de 2004 se probaron algunas alternativas para trabajar aquellas muestras que no resultaban por chelex. Se probaron con éxito 2 métodos; Extracción de ADN por columnas de silica (Anexo 2) y concentración de muestras ya extraídas por Unidades de Filtración "Microcon" (Anexo 3).

La extracción por Silica se realizó utilizando el Kit comercial "Jet Quick Tissue DNA Spin Kit" de la marca Alemana GENOMED. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, obteniéndose perfiles genéticos de muestras que anteriormente se habían hecho muchas veces por chelex y no habían generado resultados satisfactorios.

En el caso de aquellas muestras que habían dado un perfil parcial por chelex (6 o mas marcadores) se concentraron utilizando Unidades de Filtración "Microcon" (MILIPORE®)

y se volvieron a amplificar, obteniéndose un perfil genético con el resto de los marcadores en la mayoría de las muestras. Para determinar si la muestra que no resultaba por chelex debía ser extraída nuevamente por columnas de silica o solo concentrarla por microcon se observó si el perfil genético de la extracción por chelex presentaba claramente el marcador AHT 4. De ser así se concentraba la muestra y de lo contrario se extraía por silica.

C) Flexibilización en los informes.

Otro problema que se presento fue la obtención de perfiles incompletos, en los que los marcadores de mayor peso molecular no se detectaban (ASB2 y HMS2). En muchos casos fue imposible obtener perfiles con 12 marcadores, ya sea por que el DNA estaba muy degradado o por que la cantidad de DNA molde existente era muy baja en relación a lo que el nuevo Kit exigía. Por esta razón se recalculó el "Índice de Exclusión a Priori" con los 10 marcadores restantes para evaluar si las paternidades podían ser informadas obviando los dos marcadores conflictivos. No hubo diferencias importantes entre los valores calculados con los 12 marcadores y el valor obtenido con 10 marcadores (0.99 y 0.98 respectivamente). Ambos resultados están dentro de los parámetros aceptados para validar la técnica, por lo que se informaron las paternidades en las que no se logró amplificar los 2 últimos marcadores.

Al finalizar el proyecto se ha logrado estandarizar en forma optima cada una de las etapas del análisis de marcadores genéticos en Equinos pero se sigue trabajando en modificaciones tendientes a reducir los costos por un lado y a elevar la calidad por otro.

Fabricación de un Kit para determinación de perfiles genéticos en Equino.

Durante este periodo se trabajó en la elaboración un Kit de amplificación de marcadores genéticos en Equinos, obteniéndose algunos resultados prometedores. Sin embargo al termino del período del proyecto no se alcanzó a terminar su estandarización.

En un principio se pensó en desarrollar un kit idéntico al kit comercial con que se trabajó los primeros años del proyecto (StockMarks® For Horses 12 plex), es decir una reacción "cuádruplex" y otra "octuplex". Luego de varios intentos se descartó esta opción debido a que la estandarización de la reacción Octuplex presentó muchísimas dificultades no pudiéndose obtener resultados satisfactorios.

Por esta razón se decidió elaborar un Kit con 3 mix, cada uno con 4 pares de marcadores.

El desarrollo del Kit se planteo en base a 2 parámetros; afinidad entre los distintos pares de partidores y dificultad de amplificación de cada sistema alélico.

Los marcadores que irían en cada mix, fueron elegidos de acuerdo a la dificultad que presentan para amplificarse, es decir el primer Mix con los 4 marcadores que amplifican en la gran mayoría de las muestras, un segundo mix con los 4 siguientes marcadores y un tercer mix con los 4 marcadores que presentan mayor dificultad al ser amplificados.

Los Mix quedan de la siguiente forma:

Mix 1: VHL20, HTG4, AHT5 y HTG7 (primers Fw y Rev en cada marcador).

Mix 2: AHT4, HTG6, ASB2 y HMS2 (primers Fw y Rev en cada marcador).

Mix 3: HMS7, HMS6, HTG10 y HMS3 (primers Fw y Rev en cada marcador).

Anteriormente se probaron los partidores en forma individual y todos amplificaron satisfactoriamente, por lo que se comenzó a estandarizar el tercer Mix, fundamentalmente por que teníamos muchas muestras que habían amplificado para todos los marcadores excepto los de este ultimo mix por lo que podíamos estandarizar la técnica al mismo tiempo en que resolvíamos paternidades pendientes.

Al finalizar el periodo del proyecto la estandarización del mix 3 estaba bastante avanzada, quedando solo hacer algunos ajustes para aumentar la resolución del marcador HMS6, el que presentó algunos problemas de amplificación. El resto de los mix aún no se han estandarizado.

Base de datos y sistema de ingreso de resultados.

Una vez que el laboratorio logró estandarizar los protocolos para la obtención de perfiles genéticos en equinos, fue necesario generar software destinados al manejo e informe de resultados.

A su vez estos resultados debían relacionarse con la base de datos del registro genealógico del Caballo Criollo Chileno, por lo que se creó un software que relacionaba ambas bases de datos. De esta forma fue posible ingresar en la base de dato de cada animal inscrito su perfil de ADN una vez que este era obtenido.

Como el objetivo de los análisis es la conservación del patrimonio genético del Caballo Criollo Chileno se hizo obligatorio el determinar la paternidad y maternidad de las crías nacidas con posterioridad al año 2001. Esta determinación también fue ingresada e informada en el software y relacionada con el registro genealógico.

En el Anexo 14 se encuentra un ejemplo de un Certificado de Paternidad y de un Perfil de ADN generado por este Software y en el Anexo 15 una imagen de la pantalla principal del programa.

Por otro lado hasta mediados del año 2004 la información referente a los pagos de las muestras, su identificación y el estado del análisis, se manejaba en planillas Excel y no estaban relacionadas con las bases de datos del registro genealógico ni de los resultados almacenados. Para poder correlacionar estas bases de datos y poder administrar y resolver situaciones en forma mas eficiente, se agregaron nuevas funciones a este software y se traspasó toda la información contenida en las planillas Excel a la base de datos del software diseñada en plataforma Access.

El proceso de adaptación fue lento principalmente debido a que en un principio se presentaron muchas dificultades en la incorporación de datos en el programa, fundamentalmente por las inconsistencias existentes en las bases de datos antiguas. Una vez depurados estos datos se incorporaron con éxito en el sistema administrativo. Por ello

se decidió dejar Enero de 2005 como fecha de inicio del trabajo en forma integra con el nuevo sistema de administrativo y dejar en desuso las planillas Excel.

En estos momentos en Chile no existe otra base de datos en ADN en el área de ganadería, que contemple el manejo tanto de los registros genealógicos de los animales como la información de su perfil genético. El modelo creado por nuestro laboratorio puede ser aplicado perfectamente al manejo de la genealogía y de los perfiles genéticos de otras especies animales.

Estandarización de las Técnicas para la obtención de perfiles genéticos en Bovinos.

El trabajo con muestras de ejemplares bovinos se realizó cuando los protocolos de obtención de perfiles genéticos en Equinos ya estaban completamente estandarizados, por lo que se aplicaron los mismos protocolos en los Bovinos.

De las 50 muestras de Bovinos en las que se trabajo se obtuvo resultados satisfactorios en el 100%. Sin embargo fue dificultoso obtener perfiles genéticos en algunas muestras, especialmente en aquellas en que no se observaba con claridad la raíz del pelo. Esta muestra fue obtenida desde el lomo del Bovino. Por esta razón se hace necesario ver si al extraer muestras de otra zona anatómica del animal se obtienen muestras de mejor calidad.

Por otro lado la empresa proveedora del Kit para determinación de perfiles genéticos en Bovinos no entrega información acerca de la nomenclatura de los alelos de cada marcador y hasta el momento de la entrega del presente informe no se obtuvo dicha información. Por esta razón se decidió arbitrariamente asignar los alelos de acuerdo al peso molecular que presentaron. Se espera cotejar esta información con los estandares internacionales existentes y corregir la nomenclatura designada en los casos en que corresponda.

Estandarización de las Técnicas para la obtención de perfiles genéticos en Caprinos.

Cuando se comenzó a trabajar en la obtención de perfiles genéticos en caprinos no existía en el mercado un Kit comercial para estos análisis, por lo que hubo que obtener información de cada uno de los marcadores descritos para esta especie. Para comenzar la estandarización se sintetizaros 6 pares de marcadores de los 14 descritos por ISAG para la determinación de perfiles genéticos en caprinos. También se realizó un análisis exhaustivo de la literatura científica internacional disponible, la que no ha generado avances importantes en este campo desde el año 1999 a la fecha.

Estos partidores estaban marcados con fluorocromos para poder ser leídos en el analizador genético de la misma forma que los marcadores Equinos y Bovinos.

Cada uno de los marcadores fue trabajado en forma independiente, sin formar múltiplex de las 50 muestras de caprinos que se analizaron y se logró obtener perfiles satisfactorios para todas ellas

Como la información acerca del rango de tamaño de cada uno de los marcadores era muy escasa fue muy difícil planificar la marcación con fluorocromo de los partidores de cada uno de los marcadores en estudio. Sin embargo con los datos obtenidos en el presente estudio se puede planificar de mejor manera la síntesis de los partidores de estos marcadores para que en un futuro se pueda generar una reacción múltiplex en la que se pueda discriminar en forma correcta cada uno de los alelos obtenidos.

Al igual que en el caso de los Bovinos, se designo arbitrariamente la nomenclatura de los alelos, pero se pretende corroborar cada uno de los resultados obtenidos con los estándares internacionales.

Además queda pendiente el analizar el resto de los marcadores caprinos, generar un Kit que involucre una o varias reacciones múltiplex para estos marcadores y actualizar toda la información que exista al respecto para aplicarla al estudio de los caprinos nacionales.

Cálculo de frecuencias alélicas en Caballo Chileno Criollo.

Como metodología de trabajo se decidió en una primera etapa obtener el perfil genético de Potros reproductores, en una segunda etapa de Yeguas y en una tercera etapa de las crías. A las crías, además de obtener su perfil genético se determinó su paternidad y maternidad, análisis obligatorio para poder inscribir al animal en los registros genealógicos.

Para poder aceptar como valido el resultado se debió calcular el porcentaje de paternidad y maternidad del animal en estudio. Por esta razón fue necesario calcular las frecuencias alélicas de cada uno de los marcadores genéticos en estudio en la población analizada.

Se obtuvo una muestra de 2000 animales con el menor grado de parentesco posible, por lo que se eligió a los Potros reproductores que habían llegado en una primera etapa.

Luego de calcular las frecuencias alélicas de cada uno de los marcadores en estudio se determinó la probabilidad de exclusión a priori la que se ajustó a los valores aceptados internacionalmente.

Además se graficaron las frecuencias alélicas de cada uno de los 12 marcadores en estudio. Estos datos se muestran en el anexo 10.

Cálculo de frecuencias alélicas en Bovinos y Caprinos.

Debido al reducido tamaño de la muestra estudiada y al alto grado de parentesco entre los individuos la realización de un estudio poblacional de las frecuencias alélicas de los marcadores caprinos y bovinos no fue recomendable. En el caso de los bovinos las muestra fueron obtenidas de 50 hembras todas hijas de un numero muy reducidos de padres, y en el caso de los caprinos los 50 individuos incluían machos, hembras y sus respectivas crías.

Sin embargo de todas formas se calcularon las frecuencias alélicas encontradas para cada uno de los marcadores genéticos de estas dos especies y graficadas en los anexos 11 y 12.

Se espera aumentar el numero de análisis, de manera de generar un estudio de frecuencias alélicas a nivel poblacional para los bovinos y caprinos tal como existe en los equinos.

Problemas que se presentaron durante la ejecución del proyecto

Durante los cuatro años de ejecución del proyecto surgieron una gran cantidad de problemas e inconvenientes que fue necesario ir solucionando. Básicamente se pueden clasificar en tres grandes grupos;

A- Problemas de Contaminación

B- Problemas de rendimiento

C- Problemas de Servicio Técnico.

A) Problemas de contaminación.

En un principio no se realizó la separación de las áreas de Pre y post PCR. Esto provocó que durante el primer año de proyecto se presentaran problemas de contaminación de las muestras con productos amplificados.

Una gran cantidad de muestras comenzó a presentar resultados con mas de un perfil genético, sobretodo en aquellos marcadores que amplificaban con mayor facilidad.

Por esta razón se implementaron diversas medidas correctivas.

_ Por un lado se detuvo la emisión de informes hasta que la contaminación fuese eliminada.

_ Se descontamino todas las superficies de trabajo, se autoclavó el material y se adquirió una cámara de PCR.

_ Se delimitaron áreas de Pre y Post PCR además de habilitar una sala exclusiva para la PCR.

_ Se aplicó luz ultravioleta en las zonas de PCR previo a la realización de las reacciones.

_ Se adquirió material para trabajo exclusivo en cada una de las áreas.

Una vez incorporadas estas soluciones no se volvieron a presentar problemas de contaminación.

B- Problemas de rendimiento

A partir del tercer año de desarrollo del proyecto se empezó a generar un gran atraso en la entrega de resultados. Este atraso se debió fundamentalmente a 3 factores;

_Aumento de la cantidad de análisis a realizar. La cantidad de muestras que arribaron al laboratorio para la obtención de perfiles genéticos y análisis de filiación en el caso que corresponda, supero ampliamente las expectativas generadas al empezar el proyecto (alrededor de un 70%). Este aumento en la demanda se materializó principalmente en el tercer año por lo que generó un atraso importante en la entrega de resultados.

_Disminución en el porcentaje de perfiles genéticos satisfactorio. Como se mencionó anteriormente durante los primeros años del proyecto se usaron protocolos de trabajo que funcionaron bastante bien en un primer período. Sin embargo con el cambio en la presentación del kit comercial para la determinación de perfiles genéticos en equinos, los resultados satisfactorios disminuyeron radicalmente. Esto implico volver a estandarizar los protocolos y repetir todas aquellas muestras que no habían resultado. Esto contribuyó en forma importante a generar un atraso en el trabajo del laboratorio.

_Degradación de las muestras. Como consecuencia de los dos puntos anteriores hubo muchas muestras que estuvieron mucho tiempo sin analizarse o que si bien fueron trabajadas no se logró obtener perfiles genéticos satisfactorios. A esto se agrega el hecho que durante los 3 primeros años de desarrollo del proyecto, el almacenamiento de las muestras fue a temperatura ambiente. Esto generó que en una cantidad considerable de muestras el ADN nuclear se degradara progresivamente, por lo que aún cuando los protocolos de trabajo se habían modificado no se logró obtener resultados positivos de esas muestras. Como solución se opto por trabajar aquellas muestras un par de veces y si no se lograba obtener un perfil genético se solicitaba una nueva muestra. Con la muestras tomadas por segunda vez, se obtuvo un 100% de resultados satisfactorios.

Otra medida correctiva fue el almacenar las muestras a – 20° C hasta el momento de su análisis.

C- Problemas de Servicio Técnico.

Otro problema importante que se debió enfrentar en el laboratorio tuvo relación con el servicio técnico de los equipos de trabajo. Específicamente este problema se presentó con el Analizador Genético ABI PRISM 310.

La empresa que provee los insumos y se encarga del servicio técnico de estos equipos es la representante exclusiva de Applied Biosistem en Chile, razón por la cual no existen alternativas en caso de disconformidad con el servicio.

En cuanto a la adquisición de insumos la empresa en la mayoría de las oportunidades ha respondido oportunamente, pero los problemas se presentaron cuando el equipo comenzó a mostrar fallas.

Fundamentalmente el problema se daba por la incapacidad del servicio técnico de obtener diagnósticos certeros y oportunos, por lo que una falla del equipo significaba varios episodios de ensayo – error hasta dar con la solución definitiva. Como no existen repuestos para el equipo en stock, cada diagnostico errado significaba una semana de espera para la importación de dichos repuestos. Es decir una falla cuya solución no debería implicar mas de una semana de detención del equipo a veces significaba hasta un mes sin poder realizar análisis.

Proyecciones futuras:

Al finalizar el proyecto se han entregado 12.400 Certificaciones de perfiles genéticos de equinos. Este certificado, estimula un adecuado manejo por parte del criador en la idea de mantener y cuidar las razas de nuestro patrimonio pecuario.

Luego de la realización del proyecto, el laboratorio de ADN de la Sociedad Nacional de Agricultura se a consolidado como actor relevante en el manejo de los registros genealógicos del Caballo Criollo Chileno.

En la actualidad, la S.N.A. ha conseguido reforzar la imagen que tiene como ente administrador de Registros Genealógicos. Si bien otras organizaciones gremiales fueron sumándose a esta tarea, con el correr de los años, la antigüedad de nuestra institución refuerza y consolida esta iniciativa que se sintetiza aquí en sus aspectos esenciales.

Sin embargo se sigue optimizando las técnicas y los procedimientos técnicos del laboratorio para por un lado disminuir los costos de la técnica y por otro lado elevar la calidad de los análisis.

Además el laboratorio esta preparado técnica y profesionalmente para enfrentar nuevos desafíos en la conservación, mantención del acervo genético y el manejo del área pecuaria del país con la finalidad de cubrir las nuevas necesidades y requerimientos exigidos para el continuo crecimiento y avance de nuevas tecnologías a nivel nacional e internacional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Applied Biosystems. User Manual Amp FLSPRRProfiler Plus TM. PCR Amplification Kit . 2000.

2. Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W. y cols. (1994) A genetics linkage map for cattle. *Genetics* **136**, 619-39.

3. Crawford A.M., Dodds K.G., Ede A. J., Pierson C.A. y cols. (1995) An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* **140**,703-724.

4. Cummings, M. y William Klug. 1999. Conceptos de Genética. 5ta edición. Prentice Hall Iberia, España. Pág 814.

5. E. P. Cunningham, J. J. Dooley, R.K. Splan and D.G. Bradley. (2001). Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses. *Anim. Genet.*, **32**, 360-364.

6. G Luikart, M-P Biju-Duval, O Ertugrul, Y Zagdsuren, C Maudet, P Taberlet (1999). Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus). Anim. Genet.* **30**, 431-438.

7. L Yang, S H Zhao, K Li, Z Z Peng, G W Montgomery (1999). Determination of genetic relationships among five indigenous Chinese goat breeds with six microsatellite markers. *Anim. Genet.* **30**, 452-455.

8. Laurent Pepin, Yves Amigues, Andrée Lépingle, Jean-Luc Berthier, Albert Bensaid and Daniel Vaiman. (1995). Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity,* **74,** 53-61.

9. Lorente, J.A. 1996. El ADN y la identificación en la investigación criminal y paternidad biológica. Granado. Editorial Comares. pp 3-98.

10. PE Applied Biosystems. Equine Paternity PCR Typing Kit Protocol.1996

11. Prado Uldaricio. El Caballo Chileno. 1541 a 1914: Estudio zootécnico e histórico hípico. Imprenta Santiago. 1914.

12. Selvin, Steve. 1980. Probability of nonpaternity determined by multiple allele codominant systems. *American Journal of Human Genetics.* Vol 32, 276 – 278p.

13. Sptorno A y Hoecker G. Editores. Elementos de Biología Celular y Genética. 2ª edición. Ediciones Universidad de Chile, 1993.

14. Vaiman D., Schibler L., Bourgeois F. *et al.* (1996) A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics* **144,** 279-305.

15. Walsh, David A and Higuchi Rusell. 1991 . Chelex 100 as a Medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques. 10:506-513.

ANEXO 1: PROTOCOLO: EXTRACCION ADN CON RESINA CHELEX 5%

1.- Cortar raíz de 3 pelos por animal.

2.- Agregar 200 µL de Chelex 5%

3.- Agregar 3 µL de Proteinasa k (10 ng/mL)

4.- Vortex y Spin.

5.- Incubar a 56 °C, toda la noche.

6.- Vortex 5-10 seg.

7.- Spin a 14000 rpm. (5 seg)

8.- Incubar a ebullición, durante 8 min

9.- Vortex 5-10 seg

10.- Centrifugar durante 5 min a 14000 rpm

11.- Transferir 80 µL del sobrenadante a otro tubo eppendorf. Rotular con número interno y nombre.

12.- Cuantificar en gel de agarosa 0.8%

ANEXO 2: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN POR COLUMNAS CON SILICA (GENOMED)

1-Corte de 20 raíces.

2-Agregar 200ul de **buffer T1**.

3-Agregar 25 ul de **proteinaza K**(20 ng/ul)

4-Incubar 56° over night (toda la noche).

5-Agregar 200 ul **buffer T2**.

6-Vortex, hasta homogenizar muestra.

7-Incubar a 70° por 10 min.

8-Llevar a t° ambiente.

9-Agregar 200 ul **etanol 100%**.agitar enérgicamente para evitar precipitación del ADN.

10-Vortex.

11-Preparar columnas y rotular con numero asignado.

12- Transferir del tubo original a columna.

13-Centifugar por 1 min a 10.500 RPM.

14-Descartar liquido del contenedor.

15-Agregar 500 ul de **buffer TX.**

16-Centrifugar por 1 min a 10.500 RPM.

17- Descartar liquido del contenedor.

18- Agregar 500 ul de **buffer T3**.

19- Centrifugar por 1 min a 10.500 RPM.

20- Descartar liquido del contenedor.

21- Centrifugar por 2 min a 14.000 RPM.

22-Transferir columna a tubo ependorf y agregar 50 ul de agua a 70°.

23- Centrifugar por 2 min a 10.500 RPM.

24-Rotular tubo ependorf y guardar columnas usadas.

ANEXO 3: PROTOCOLO CONCENTRACION DE MUESTRAS POR COLUMNAS MICROCON

1- Agregar 50 ul de H2O a columna (por lado azul)

2- Agregar totalidad de muestra a concentrar.

3- Centrifugar por 10 min a 4000 rpm.

4- Lavar con 200ul H2O por 10 min a 4000 rpm.(Repetir en forma opcional)

5-Verificar que la membrana de la columna se presente seca.

6- Agregar volumen de con. final (20 ul) en membrana y hacer up down.

7- Invertir columna en tubo definitivo rotulado.

8- Centrifugar por 5 min a 4000 rpm.

9- Descartar membrana y guardar tubo concentrado.

ANEXO 4: PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES EQUINOS CON EL KIT "STOCKMARCKS ® FOR HORSE EQUINE GENOTYPING KIT 12 PLEX" (APPLIED BIOSYSTEMS).

A) Reacción Octuplex

1- Realizar un mix de acuerdo al siguiente esquema:

Componentes	**Volumen (por reacción)**
StockMarks PCR Buffer	2.5 ul
dNTP mix	4.0 ul
AmpliTaq Gold DNA Polymerasa	0.5 ul
Partidor VHL20	0.5 ul
Partidor HTG4	0.5 ul
Partidor AHT4	0.5 ul
Partidor HMS7	0.5 ul
Partidor HTG6	0.5 ul
Partidor HMS6	0.5 ul
Partidor HTG7	0.5 ul
Partidor HMS3	0.5 ul
Agua desionizada	3.0 ul
Volumen total	14.0 ul

2- Vortex del master mix.

3- Alicuotar 14 µL del master mix, utilizando un tubo de 0.2 por cada animal.

4- Agregar 1 µL de ADN templado, (Su concentración puede variar en rangos de 10 ng/µLa 100 ng/µL).

5- Vortex de cada tubo

6- Spin para asegurar que el contenido de cada tubo permanezca en su parte inferior.

7- Amplificar PCR en termociclador.

B) Reacción Cuádruples

1- Realizar un mix de acuerdo al siguiente esquema:

Componentes	**Volumen (por reacción)**
StockMarks PCR Buffer	2.5 ul
dNTP mix	4.0 ul
AmpliTaq Gold DNA Polymerasa	0.5 ul
Partidor AHT5	0.5 ul
Partidor ASB2	0.5 ul
Partidor HTG10	0.5 ul
Partidor HMS2	0.5 ul
Agua desionizada	5.0 ul
Volumen total	14.0 ul

2- Vortex del master mix.

3- Alicuotar 14 µL del master mix, utilizando un tubo de 0.2 por cada animal.

4- Agregar 1 µL de ADN templado, (Su concentración puede variar en rangos de 10 ng/µLa 100 ng/µL).

5- Vortex de cada tubo

6- Spin para asegurar que el contenido de cada tubo permanezca en su parte inferior.

7- Amplificar PCR en termociclador.

C) Programa de amplificación

Paso inicial	30 ciclos			Extensión Final	Finalizar
	Denaturación	Hibridación	Extensión		
10 min 95° C	30 seg. 95° C	30 seg 60° C	60 seg 72° C	60 min 72° C	4° C

ANEXO 5: PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES EQUINOS CON EL KIT "STOCKMARCKS ® FOR HORSE EQUINE GENOTYPING KIT 17 PLEX" (APPLIED BIOSYSTEMS).

1- Realizar un mix de acuerdo al siguiente esquema:

Componentes	**Volumen (por reacción)**
StockMarks PCR Buffer	2.5 ul
dNTP mix	4.0 ul
AmpliTaq Gold DNA Polymerasa	0.5 ul
Mix partidores	3.0 ul
Agua desionizada	4.0 ul
Volumen total	14.0 ul

2- Vortex del master mix.

3- Alicuotar 14 µL del master mix, utilizando un tubo de 0.2 por cada animal.

4- Agregar 1 µL de ADN templado, (Su concentración puede variar en rangos de 10 ng/µLa 100 ng/µL).

5- Vortex de cada tubo

6- Spin para asegurar que el contenido de cada tubo permanezca en su parte inferior.

7- Amplificar PCR en termociclador.

C) Programa de amplificación

Paso inicial	30 ciclos			Extensión Final	Finalizar
	Denaturación	Hibridación	Extensión		
10 min 95° C	30 seg. 95° C	30 seg 60° C	60 seg 72° C	60 min 72° C	4° C

ANEXO 6: PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES BOVINOS CON EL KIT "STOCKMARCKS CATTLE ® BOVINE GENOTYPING KIT 11 PLEX" (APPLIED BIOSYSTEMS).

1- Realizar un mix de acuerdo al siguiente esquema:

Componentes	**Volumen (por reacción)**
StockMarks PCR Buffer	3.0 ul
dNTP mix	4.0 ul
AmpliTaq Gold DNA Polymerasa	0.5 ul
Mix partidores	5.5 ul
Agua desionizada	1.0 ul
Volumen total	14.0 ul

2- Vortex del master mix.

3- Alicuotar 14 µL del master mix, utilizando un tubo de 0.2 por cada animal.

4- Agregar 1 µL de ADN templado, (Su concentración puede variar en rangos de 10 ng/µLa 100 ng/µL).

5- Vortex de cada tubo

6- Spin para asegurar que el contenido de cada tubo permanezca en su parte inferior.

7- Amplificar PCR en termociclador.

C) Programa de amplificación

Paso inicial	31 ciclos			Extensión Final	1 ciclo	Finalizar
	Denaturación	Hibridación	Extensión			
10 min	45 seg.	45 seg	60 seg	60 min	2 hr	4° C
95° C	95° C	61° C	72° C	72° C	25°C	

ANEXO 7: PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES CAPRINOS.

1- Realizar un mix para cada uno de los marcadores de acuerdo al siguiente esquema:

Componentes	**Volumen (por reacción)**
Bioaxis DNA Polymerase Buffer 10 X	1.0 ul
$MgCl_2$ 50 mM	1.0 ul
dNTP mix 1.25 mM	2.0 ul
Partidor forward	0.4 ul
Partidor Revderse	0.4 ul
BioAxis DNA Polymerase	0.2 ul
Agua desionizada	1.0 ul
Volumen total	6 ul

2- Vortex del master mix.

3- Alicuotar 6 µL del master mix, utilizando un tubo de 0.2 por cada animal.

4- Agregar 4 µL de ADN templado, (Su concentración puede variar en rangos de 10 ng/µLa 100 ng/µL).

5- Vortex de cada tubo

6- Spin para asegurar que el contenido de cada tubo permanezca en su parte inferior.

7- Amplificar PCR en termociclador.

C) Programa de amplificación

Paso inicial	35 ciclos			Extensión Final	Finalizar
	Denaturación	Hibridación	Extensión		
5 min 95° C	25 seg. 95° C	30 seg 55° C	30 seg 72° C	30 min 72° C	4° C

ANEXO 8: CONDICIONES DE ELECTROFORESIS EQUIPO ABI 310 PARA MARCADORES EQUINOS BOVINOS Y CAPRINOS.

Marcadores		Standar	Matriz	Modulo	Sample
Equinos	12 plex	Gen Scan ROX 350	A	GS STR POP4 (1 ml)A	4 colores
	17 plex	Gen Scan LIZ 500	G	GS STR POP4 (1 ml)G5	5 colores
Bovinos		Gen Scan ROX 350	A	GS STR POP4 (1 ml)A	4 colores
Caprinos		Gen Scan ROX 350	F	GS STR POP4 (1 ml)F	4 colores

ANEXO 9: DENATURACION DE LAS MUESTRAS Y PREPARACIÓN PARA LA ELECTROFORÉSIS.

I Preparación de las muestras:

A) Marcadores equinos 12 plex.

- Rotular el tubo.
- Agregar 1,5 ul de producto amplificado en la reacción cuádruplex.
- Agregar 1,5 ul de producto amplificado en la reacción octuplex.
- Agregar 11 ul de formamida deionizada.
- Agregar 0.5 ul de Gen Scan ROX 350.

B) Marcadores equinos 17 plex.

- Rotular el tubo.
- Agregar 2 ul de producto amplificado.
- Agregar 11 ul de formamida deionizada.
- Agregar 0.5 ul de Gen Scan LIZ 500.

C) Marcadores Bovinos.

- Rotular el tubo.
- Agregar 2 ul de producto amplificado.
- Agregar 11 ul de formamida deionizada.
- Agregar 0.5 ul de Gen Scan ROX 350.

D) Marcadores Caprinos.

- Rotular 3 tubos por muestra.
- En el primer tubo agregar 1 ul de producto amplificado del marcador SRCRSP24 y 1 ul del marcador SRCRSP8.

- En el segundo tubo agregar 1 ul de producto amplificado del marcador INRA5 y 1 ul del marcador SRCRSP5.
- En el tercer tubo agregar 1 ul de producto amplificado del marcador TGLA53 y 1 ul del marcador ETH10.
- Agregar 11 ul de formamida deionizada.
- Agregar 0.5 ul de Gen Scan ROX 350.

II Denaturación de las muestras.

1 Vortex enérgico.

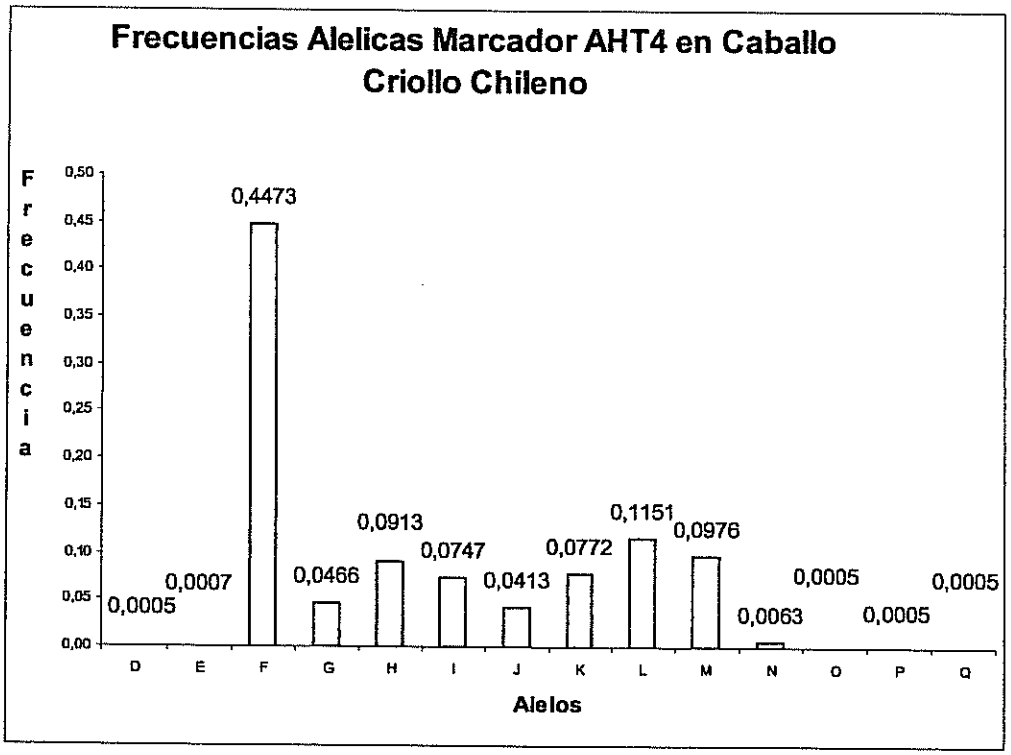
2 Spin.

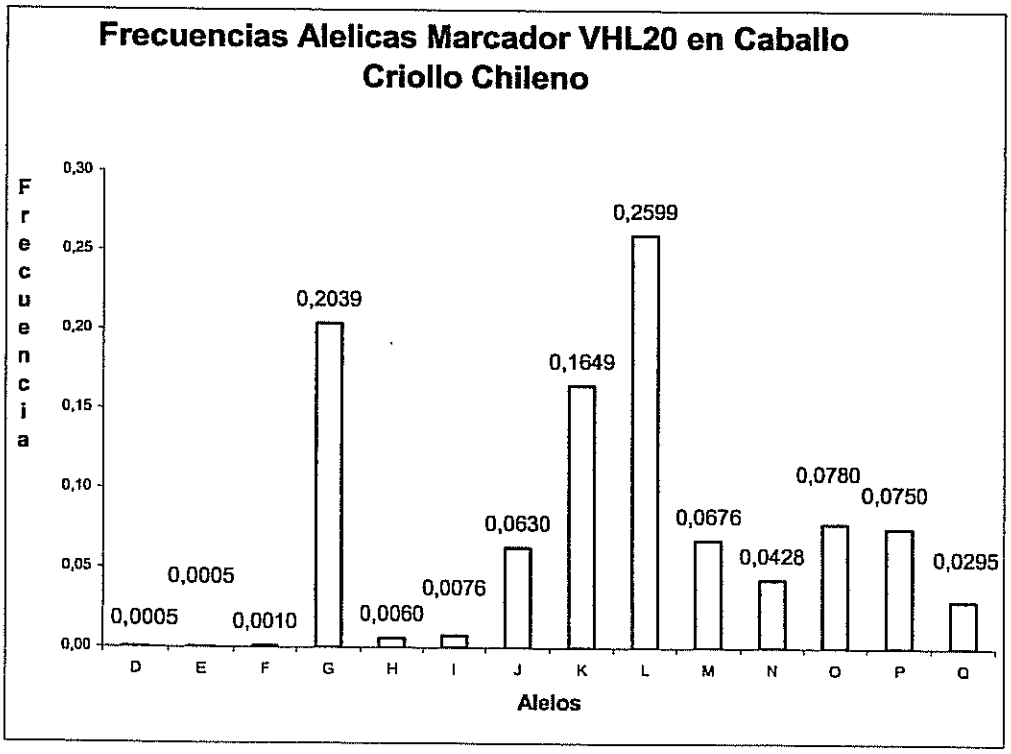
3 Denaturar la muestras por 5 minutos a 95° C.

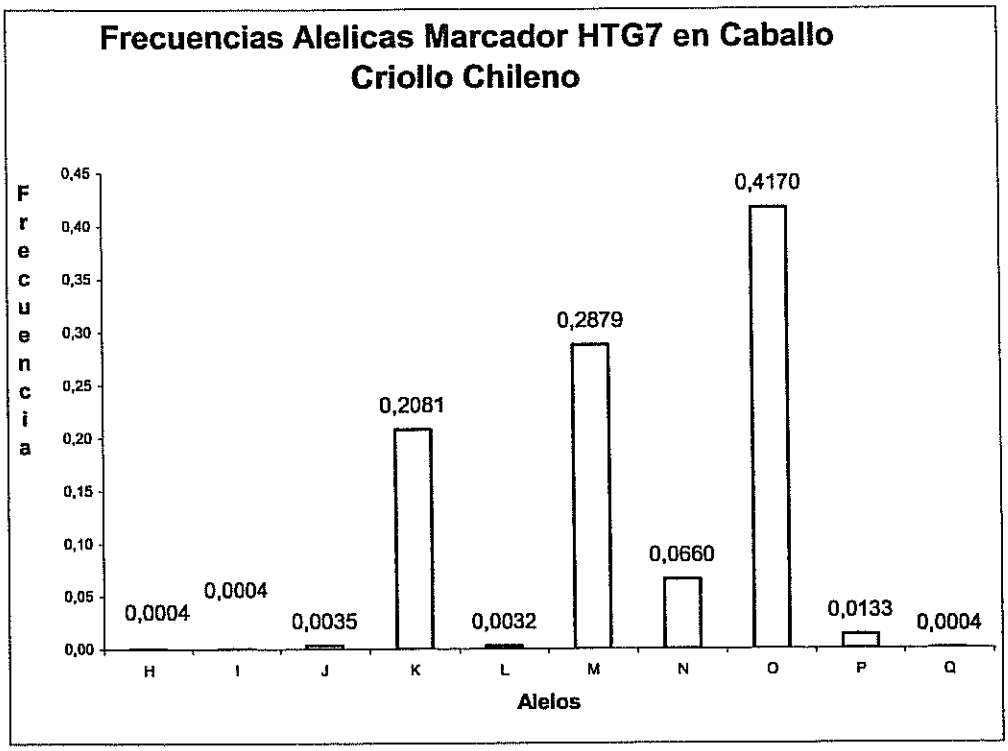
4 Enfriar rápidamente a 4° C.

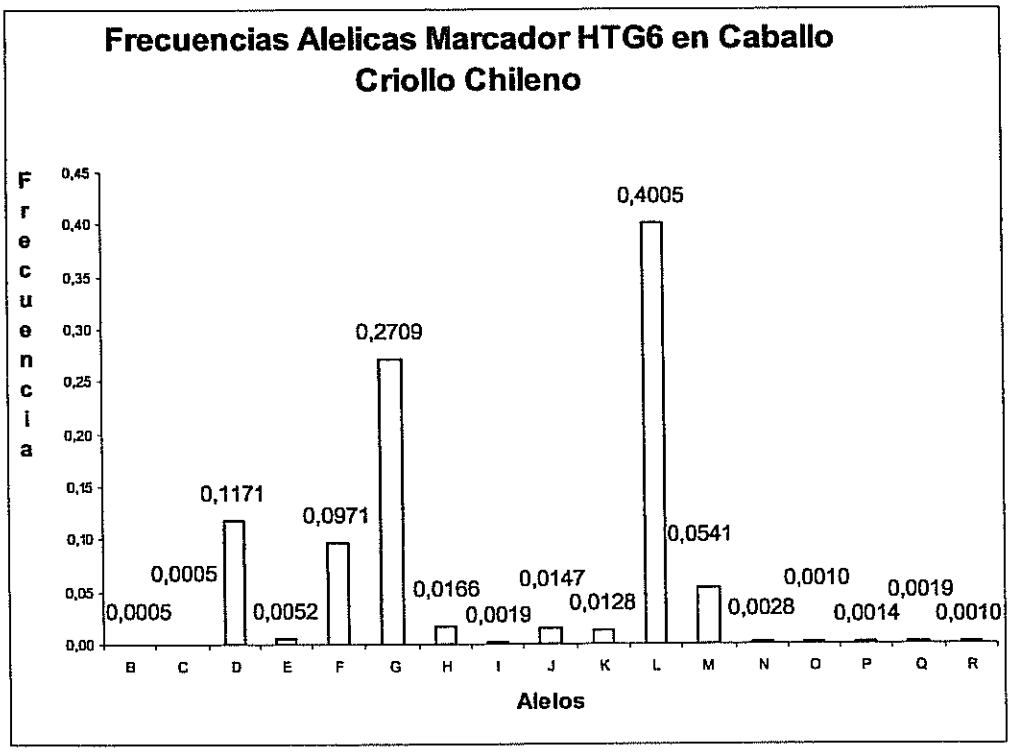
5 Programar muestras en Analizador Genético.

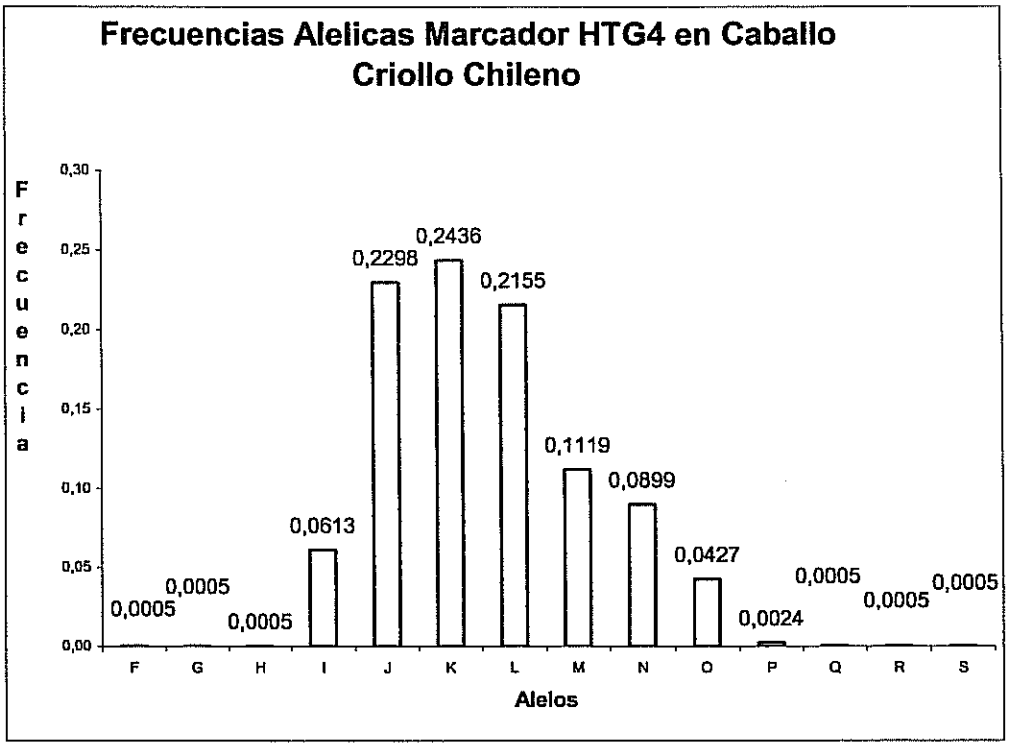
ANEXO 10: FRECUENCIAS ALELICAS DE 12 MARCADORES EQUINOS.

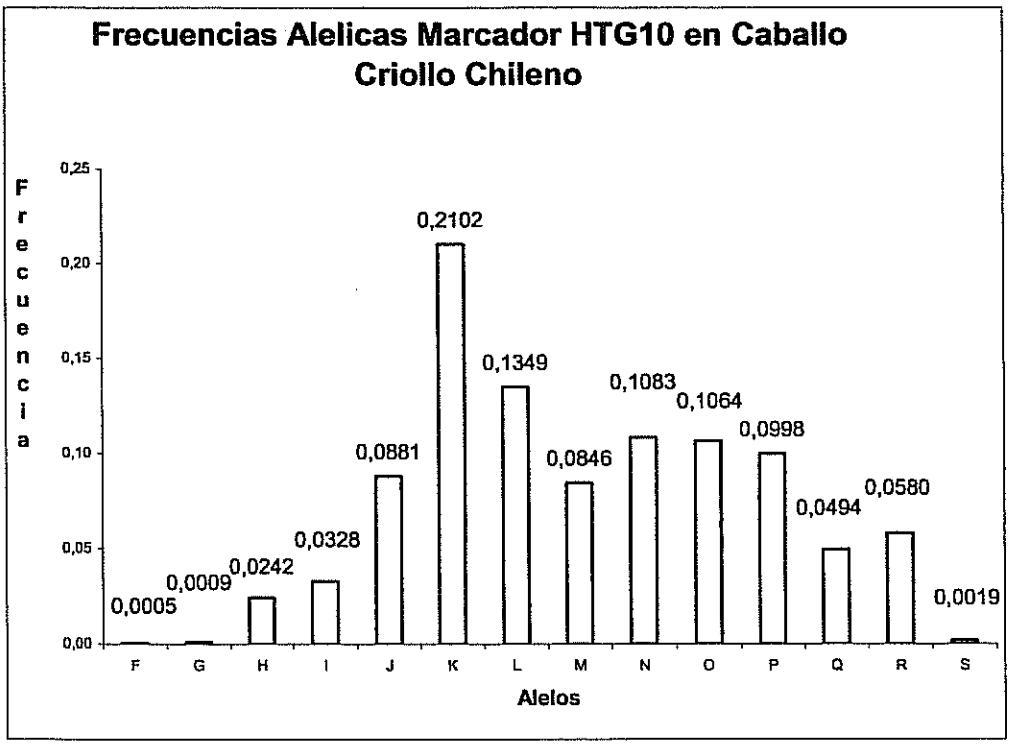


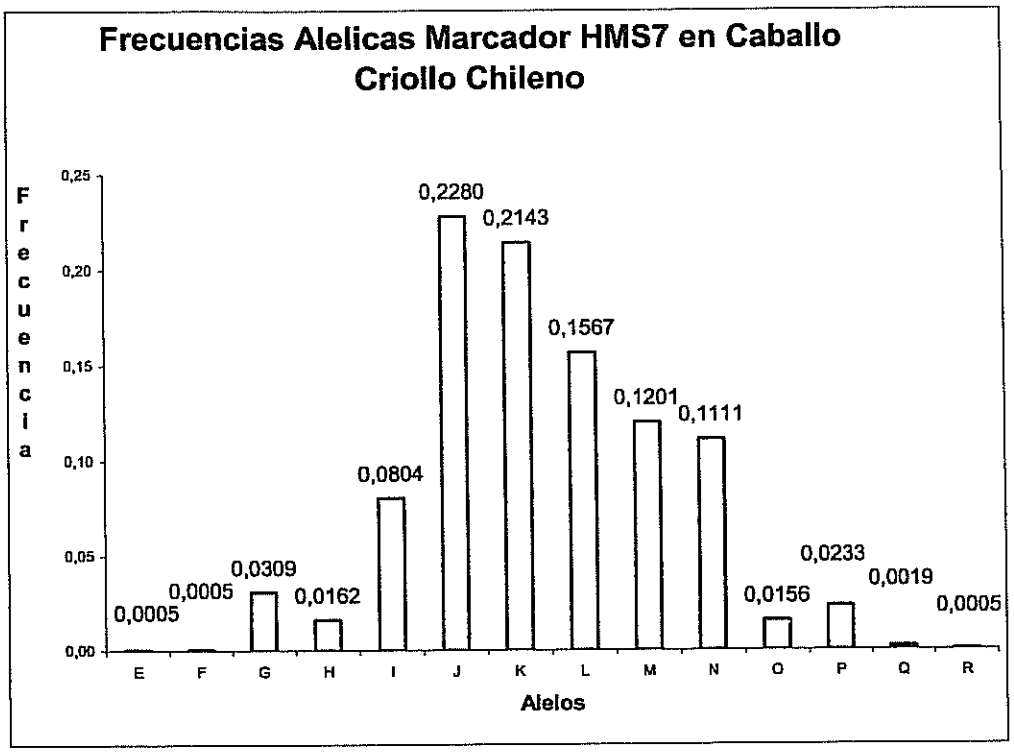


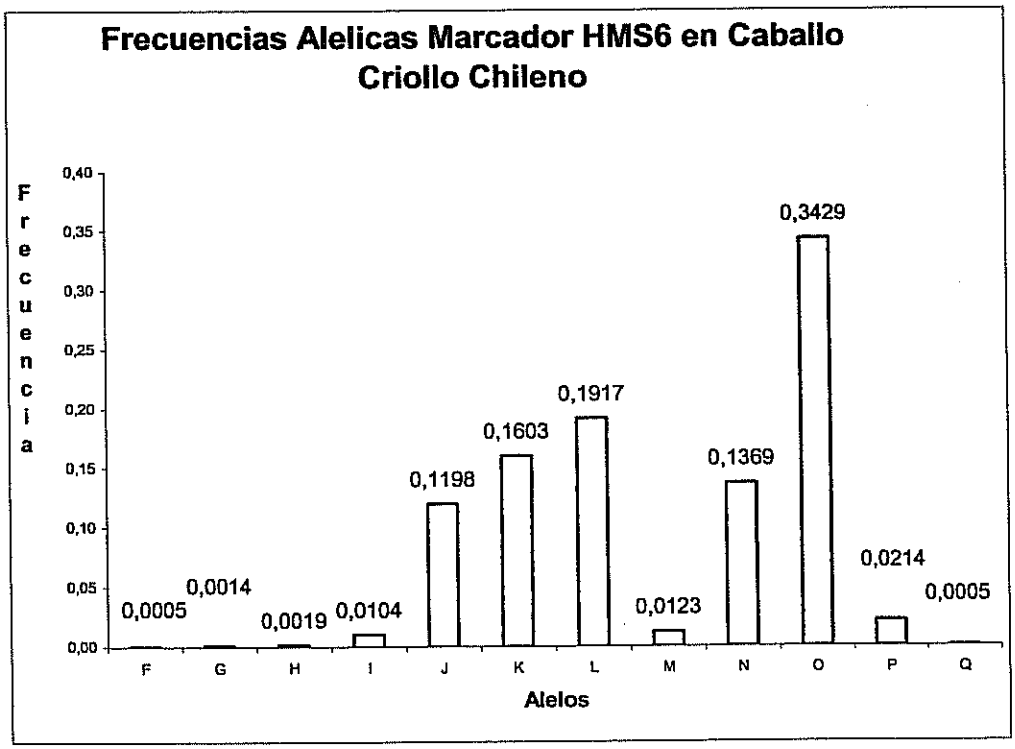

Frecuencias Alelicas Marcador HTG7 en Caballo Criollo Chileno
Frecuencia
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,0004
0,0004
0,0035
0,2081
0,0032
0,2879
0,0660
0,4170
0,0133
0,0004
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
Alelos

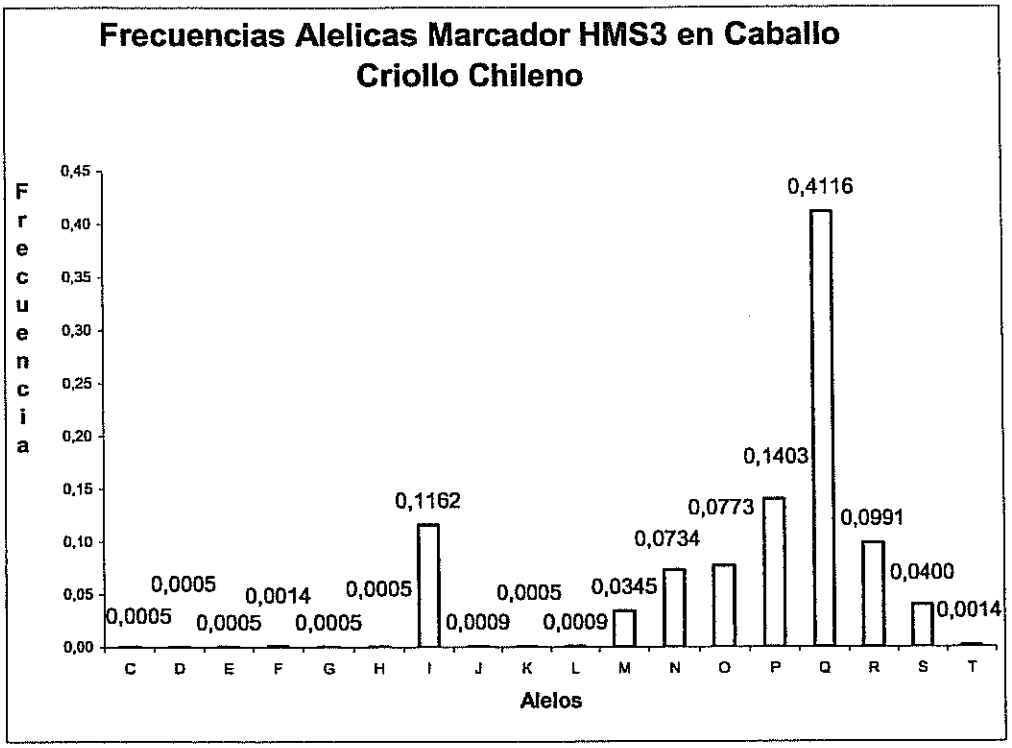

Frecuencias Alelicas Marcador HTG6 en Caballo Criollo Chileno
Frecuencia
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,0005
0,0005
0,1171
0,0052
0,0971
0,2709
0,0166
0,0019
0,0147
0,0128
0,4005
0,0541
0,0028
0,0010
0,0014
0,0019
0,0010
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
Alelos

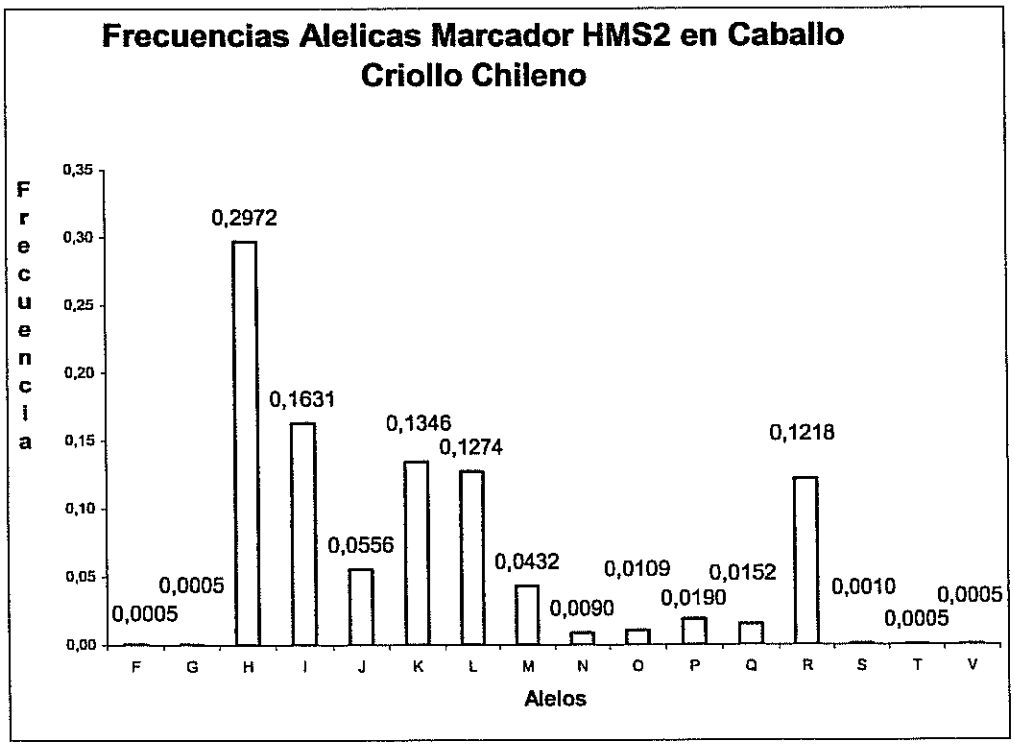

Frecuencias Alelicas Marcador HTG4 en Caballo Criollo Chileno
Frecuencia
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,0005
0,0005
0,0005
0,0613
0,2298
0,2436
0,2155
0,1119
0,0899
0,0427
0,0024
0,0005
0,0005
0,0005
F G H I J K L M N O P Q R S
Alelos

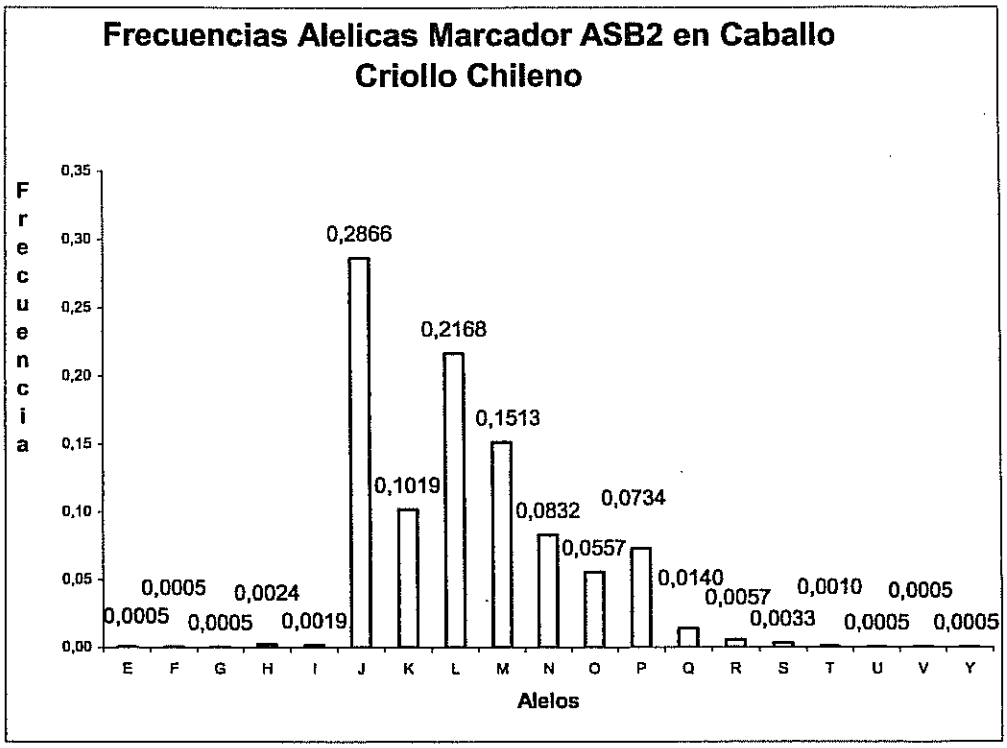

Frecuencias Alelicas Marcador HTG10 en Caballo Criollo Chileno
Frecuencia
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,0005
0,0009
0,0242
0,0328
0,0881
0,2102
0,1349
0,0846
0,1083
0,1064
0,0998
0,0494
0,0580
0,0019
F G H I J K L M N O P Q R S
Alelos

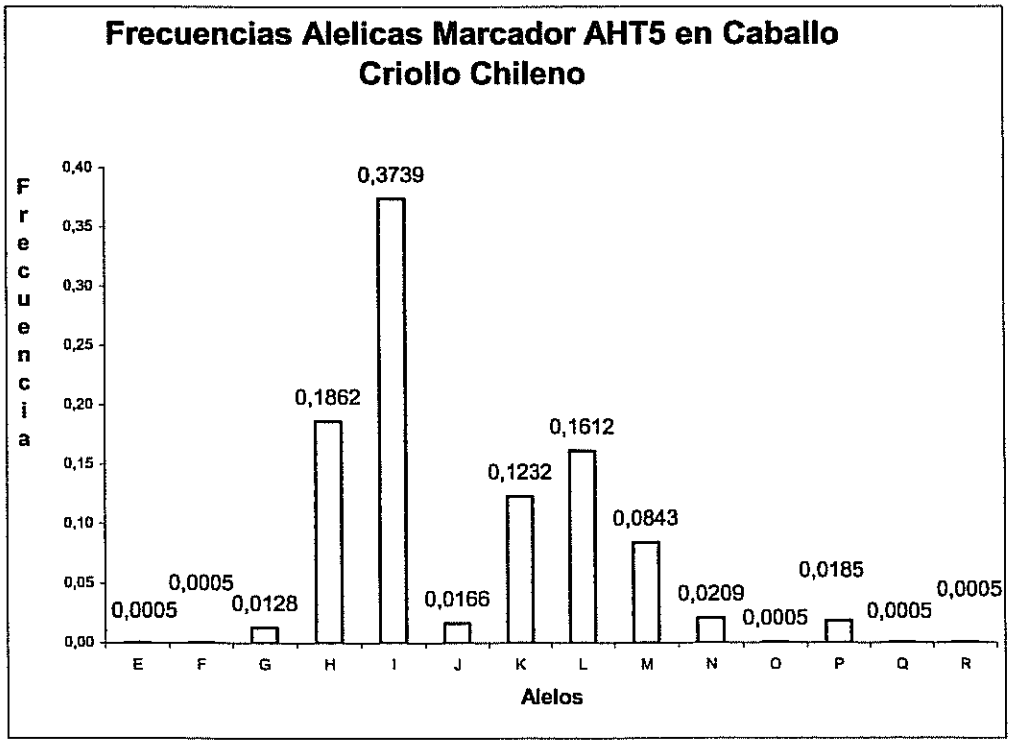

Frecuencias Alelicas Marcador HMS7 en Caballo Criollo Chileno
Frecuencia
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,0005
0,0005
0,0309
0,0162
0,0804
0,2280
0,2143
0,1567
0,1201
0,1111
0,0156
0,0233
0,0019
0,0005
E F G H I J K L M N O P Q R
Alelos


Frecuencias Alelicas Marcador HMS6 en Caballo Criollo Chileno
Frecuencia
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,0005
0,0014
0,0019
0,0104
0,1198
0,1603
0,1917
0,0123
0,1369
0,3429
0,0214
0,0005
F G H I J K L M N O P Q
Alelos

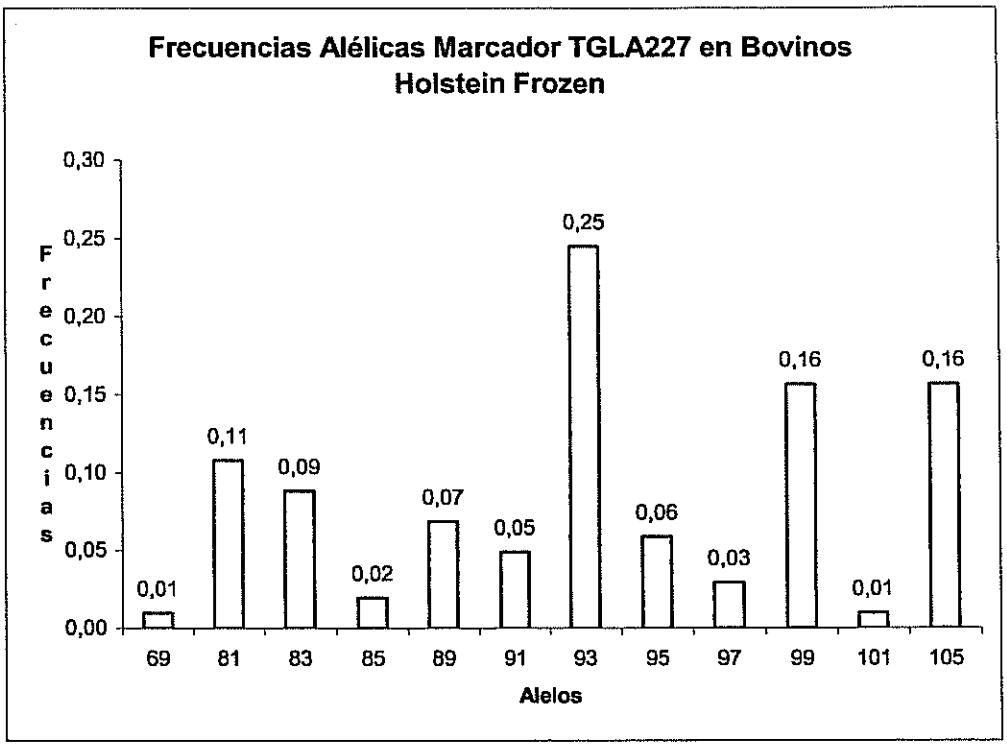

Frecuencias Alelicas Marcador HMS3 en Caballo Criollo Chileno
Frecuencia
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,0005
0,0005
0,0005
0,0014
0,0005
0,1162
0,0009
0,0005
0,0009
0,0345
0,0734
0,0773
0,1403
0,4116
0,0991
0,0400
0,0014
C D E F G H I J K L M N O P Q R S T
Alelos

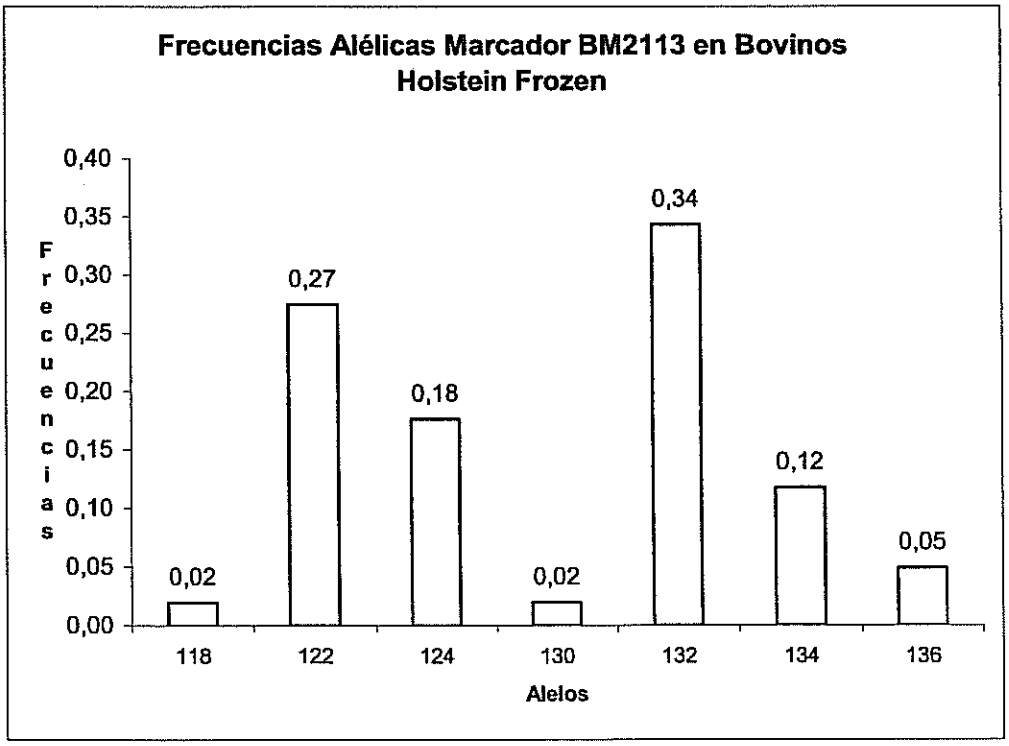

Frecuencias Alelicas Marcador HMS2 en Caballo Criollo Chileno
Frecuencia
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,0005
0,0005
0,2972
0,1631
0,0556
0,1346
0,1274
0,0432
0,0090
0,0109
0,0190
0,0152
0,1218
0,0010
0,0005
0,0005
F G H I J K L M N O P Q R S T V
Alelos

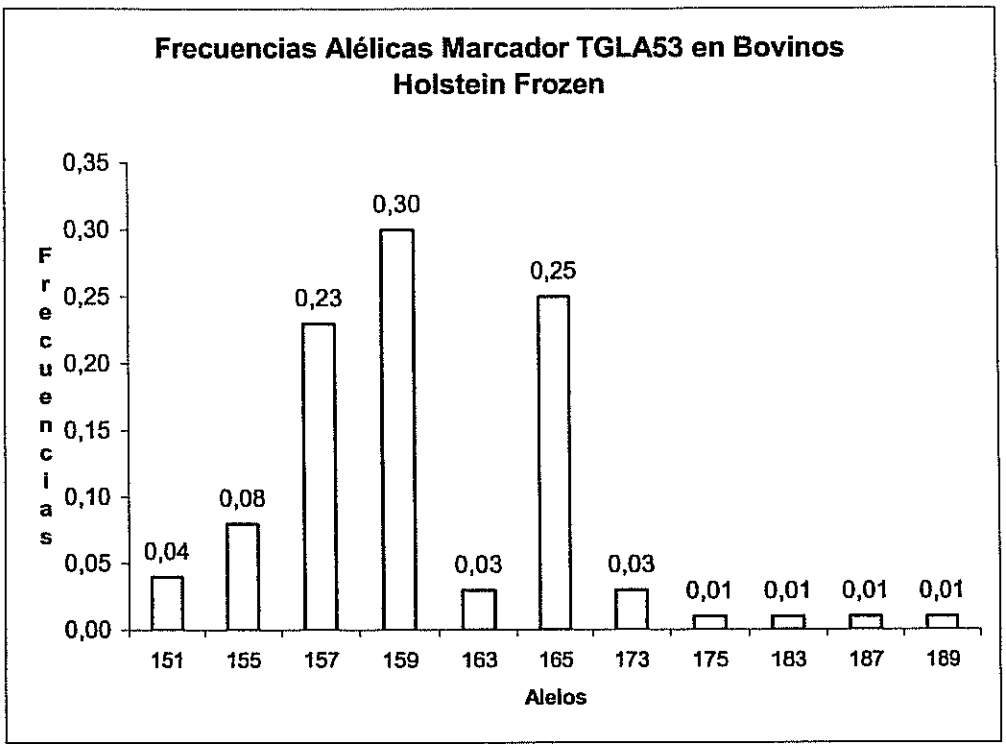

Frecuencias Alelicas Marcador ASB2 en Caballo Criollo Chileno
Frecuencia
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,0005
0,0005
0,0005
0,0024
0,0019
0,2866
0,1019
0,2168
0,1513
0,0832
0,0557
0,0734
0,0140
0,0057
0,0033
0,0010
0,0005
0,0005
0,0005
E F G H I J K L M N O P Q R S T U V Y
Alelos

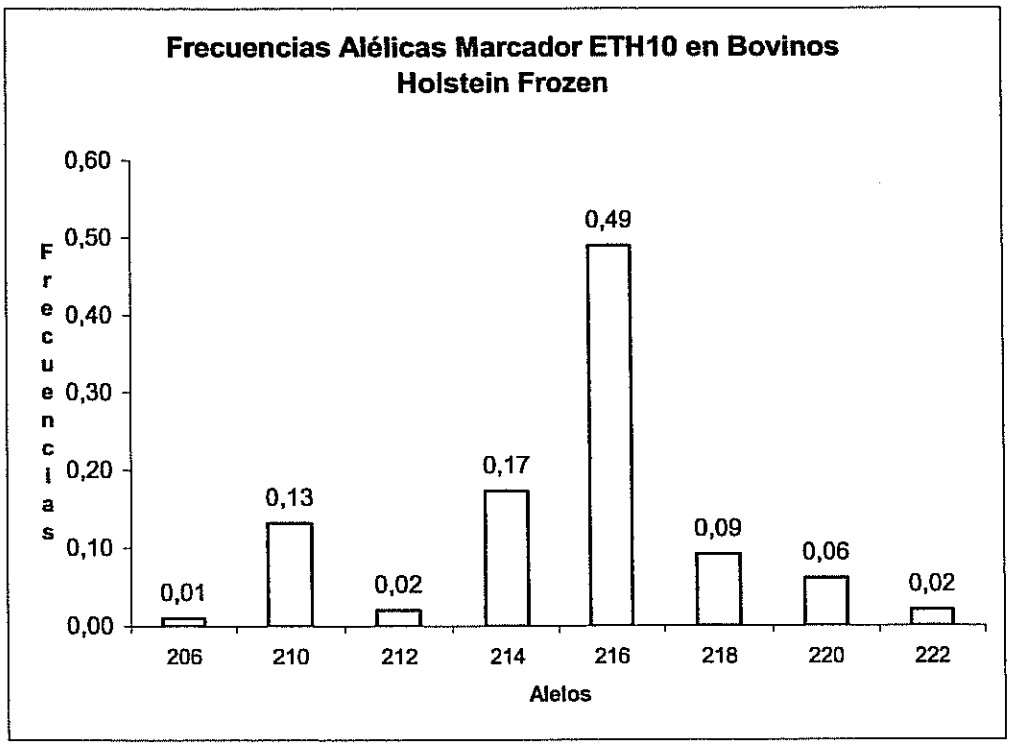

Frecuencias Alelicas Marcador AHT5 en Caballo Criollo Chileno
Frecuencia
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,0005
0,0005
0,0128
0,1862
0,3739
0,0166
0,1232
0,1612
0,0843
0,0209
0,0005
0,0185
0,0005
0,0005
E F G H I J K L M N O P Q R
Alelos

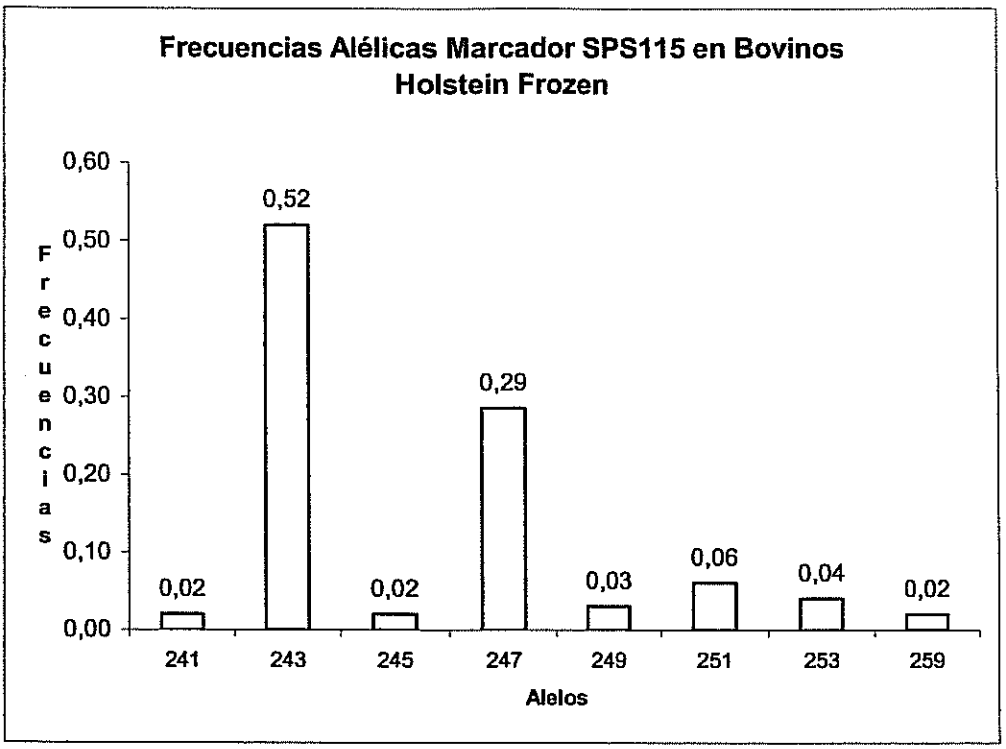
ANEXO 11: FRECUENCIAS ALELICAS DE 11 MARCADORES BOVINOS.

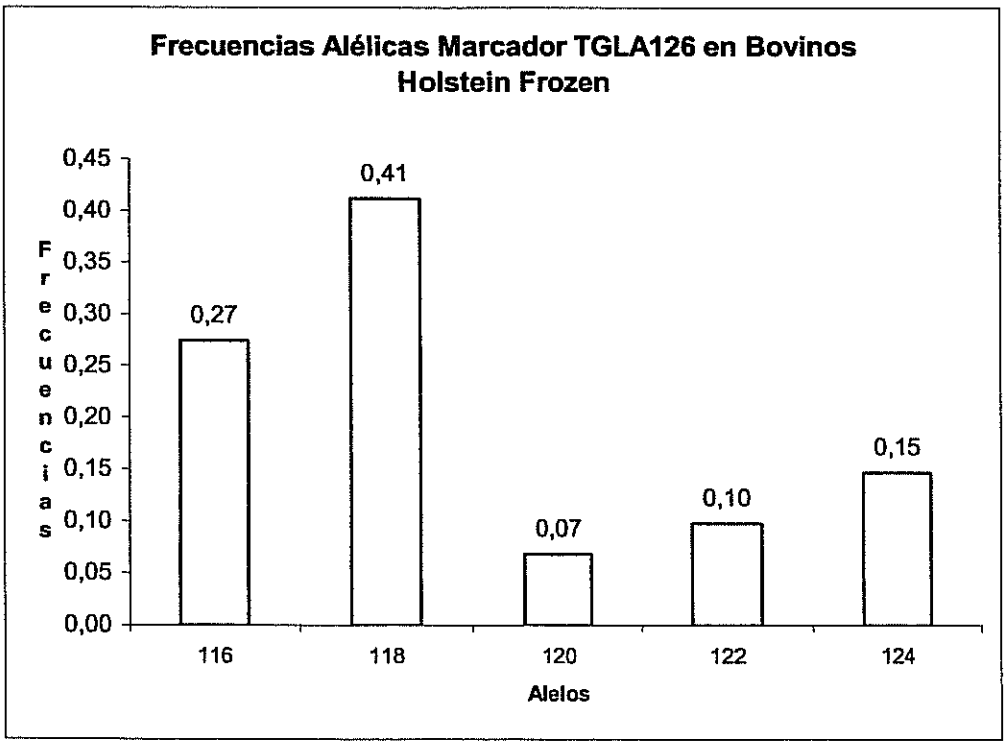


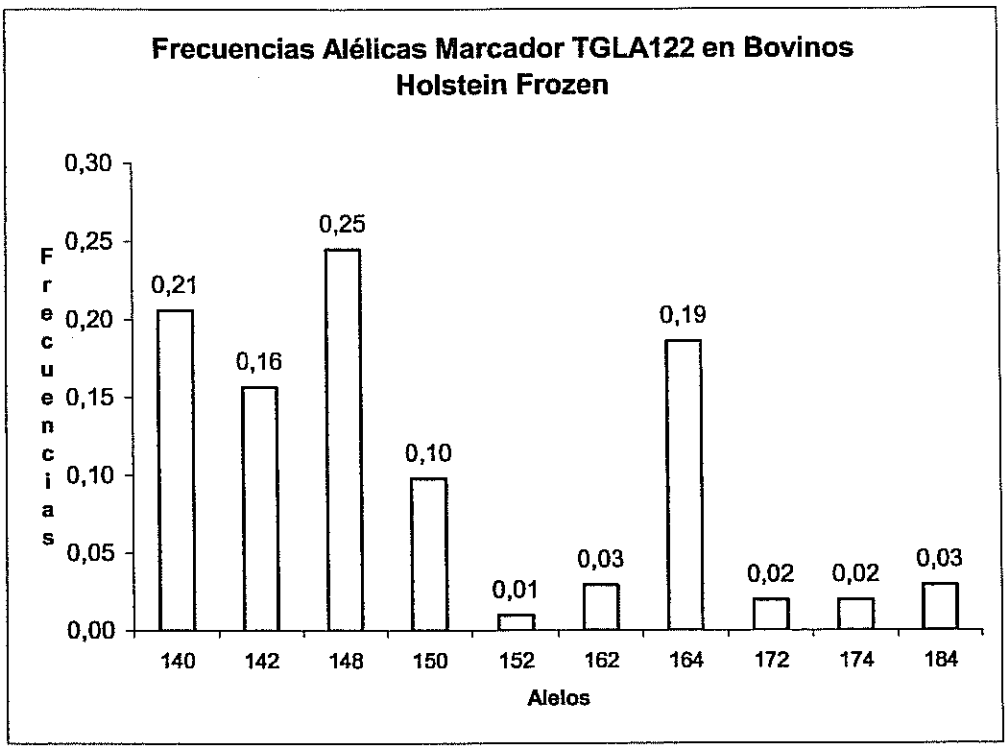


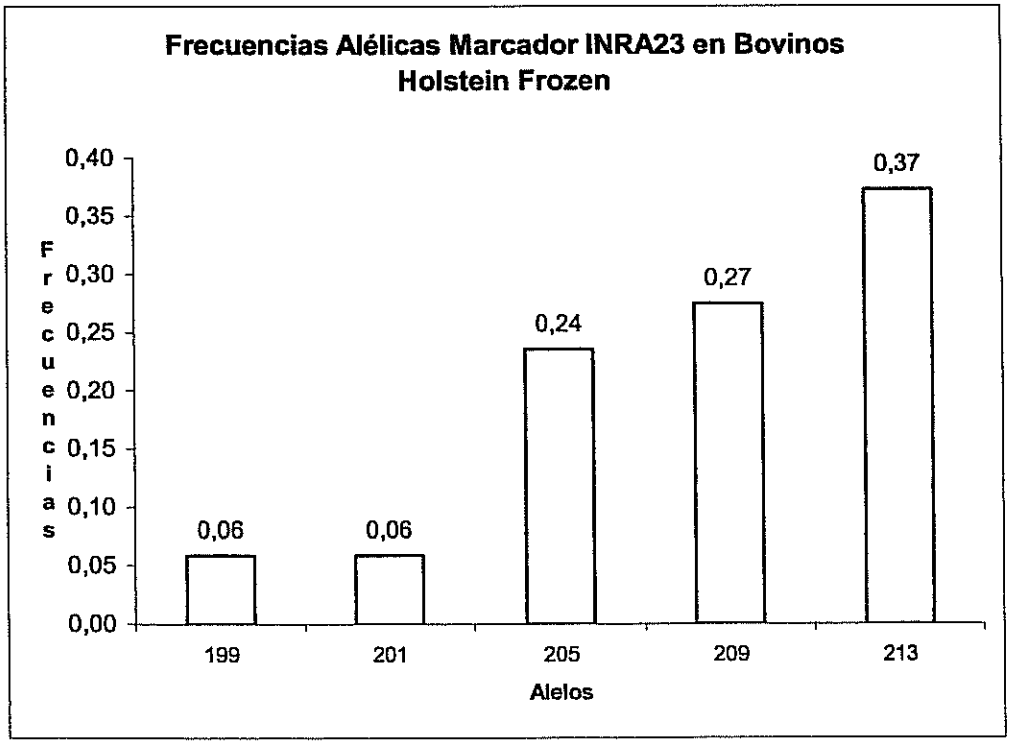

Frecuencias Alélicas Marcador TGLA53 en Bovinos Holstein Frozen
Frecuencias
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,04
0,08
0,23
0,30
0,03
0,25
0,03
0,01
0,01
0,01
0,01
151
155
157
159
163
165
173
175
183
187
189
Alelos

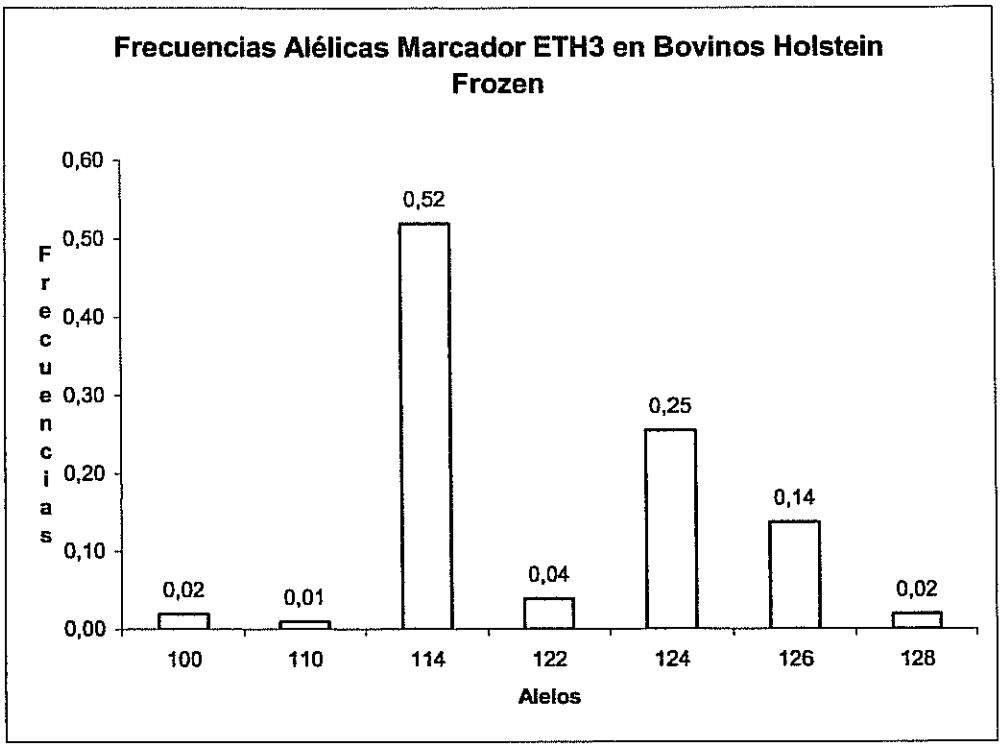

Frecuencias Alélicas Marcador ETH10 en Bovinos Holstein Frozen
Frecuencias
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
0,01
0,13
0,02
0,17
0,49
0,09
0,06
0,02
206
210
212
214
216
218
220
222
Alelos

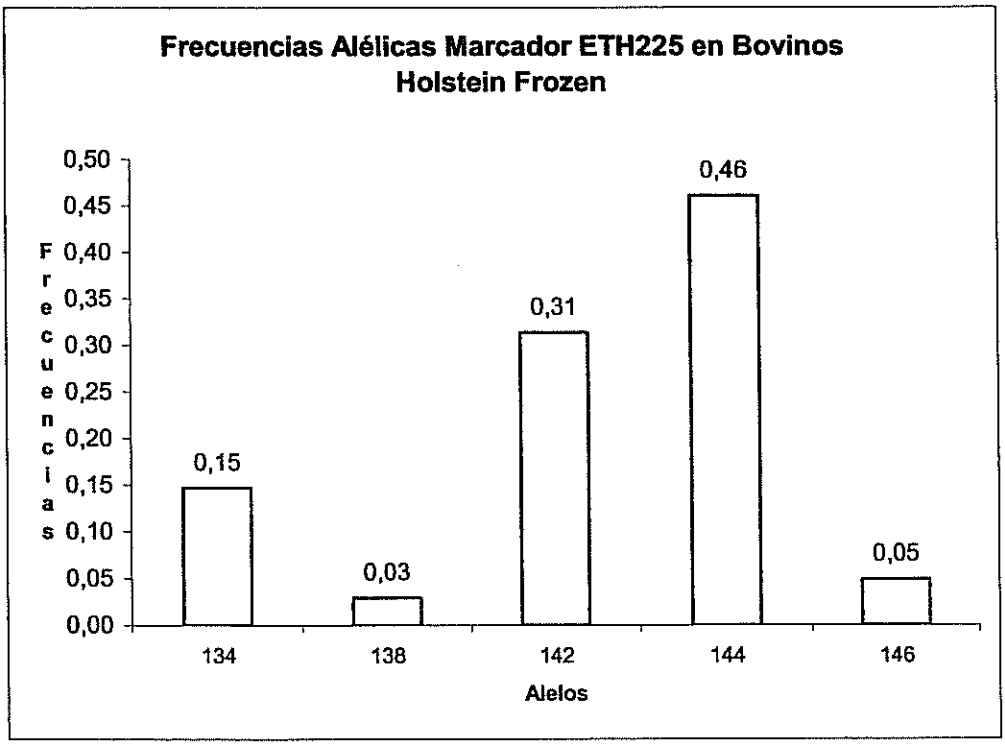

Frecuencias Alélicas Marcador SPS115 en Bovinos Holstein Frozen
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Frecuencias
0,02
0,52
0,02
0,29
0,03
0,06
0,04
0,02
241
243
245
247
249
251
253
259
Alelos

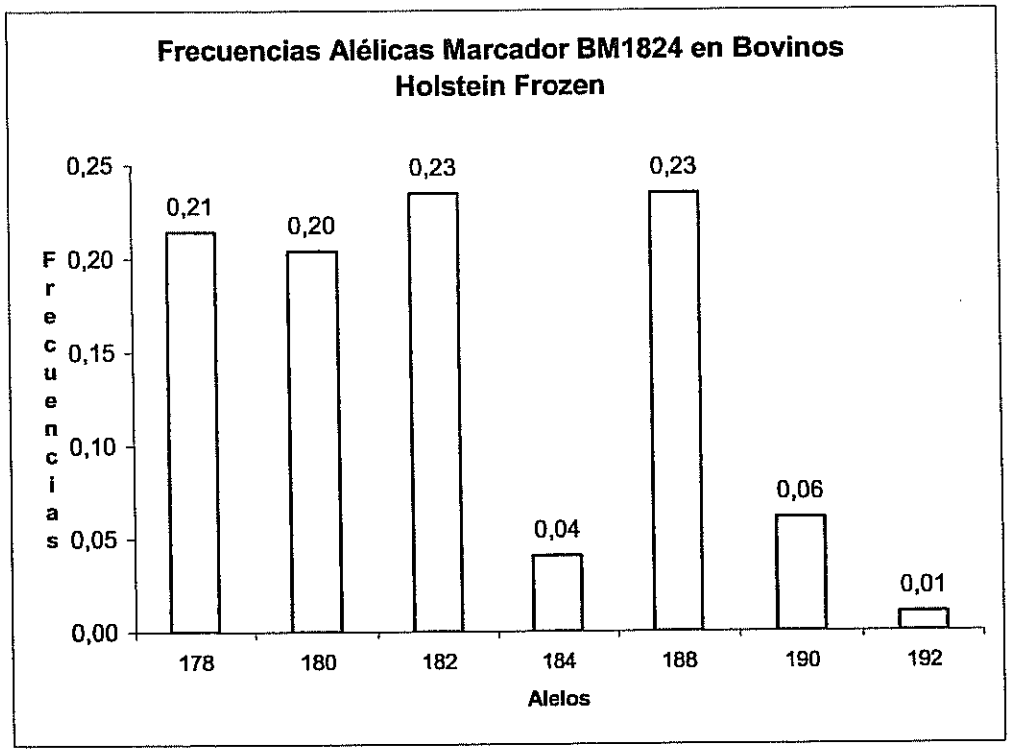

Frecuencias Alélicas Marcador TGLA126 en Bovinos Holstein Frozen
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Frecuencias
0,27
0,41
0,07
0,10
0,15
116
118
120
122
124
Alelos


Frecuencias Alélicas Marcador TGLA122 en Bovinos Holstein Frozen
Frecuencias
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,21
0,16
0,25
0,10
0,01
0,03
0,19
0,02
0,02
0,03
140
142
148
150
152
162
164
172
174
184
Alelos

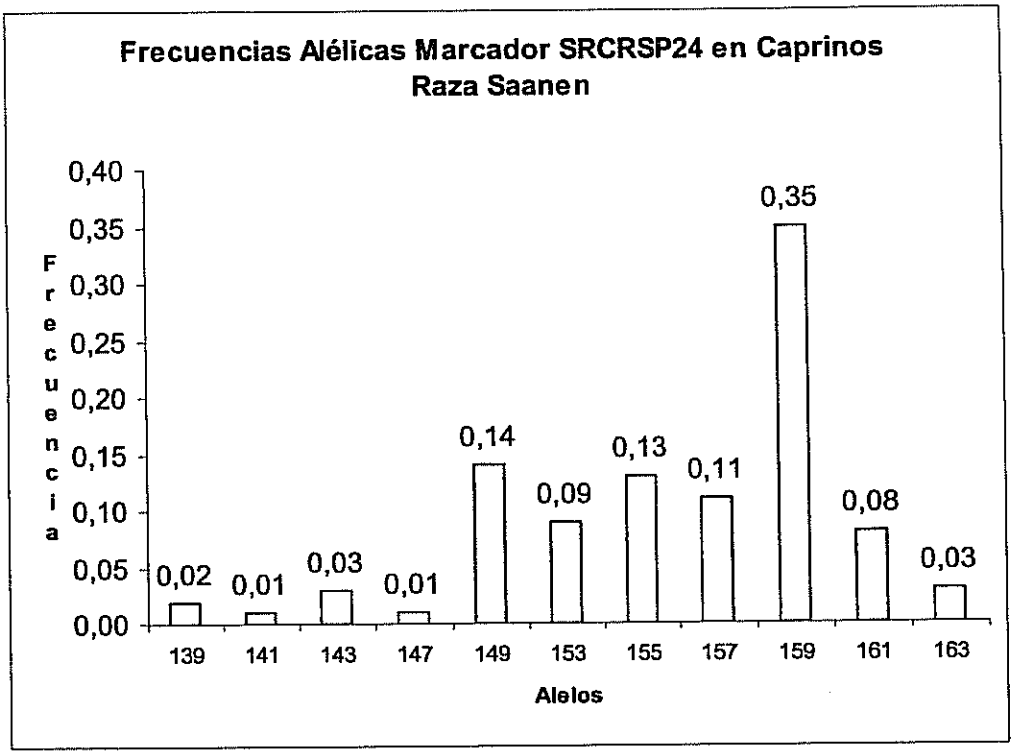

Frecuencias Alélicas Marcador INRA23 en Bovinos Holstein Frozen
Frecuencias
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,06
0,06
0,24
0,27
0,37
199
201
205
209
213
Alelos

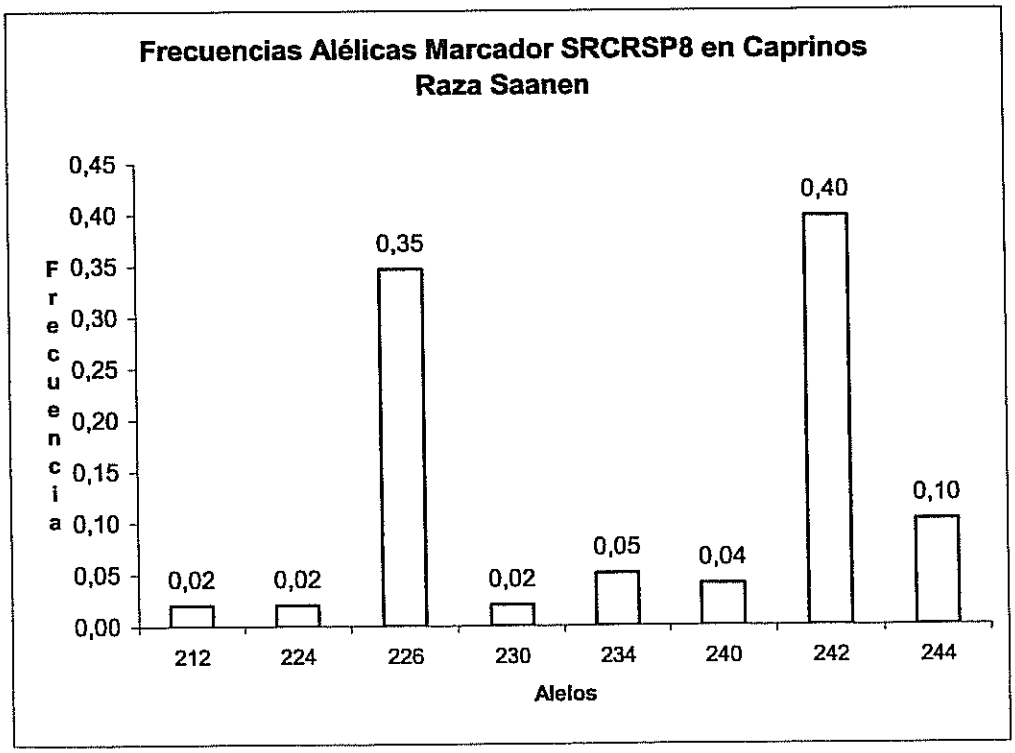

Frecuencias Alélicas Marcador ETH3 en Bovinos Holstein Frozen
Frecuencias
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
0,02
0,01
0,52
0,04
0,25
0,14
0,02
100
110
114
122
124
126
128
Alelos

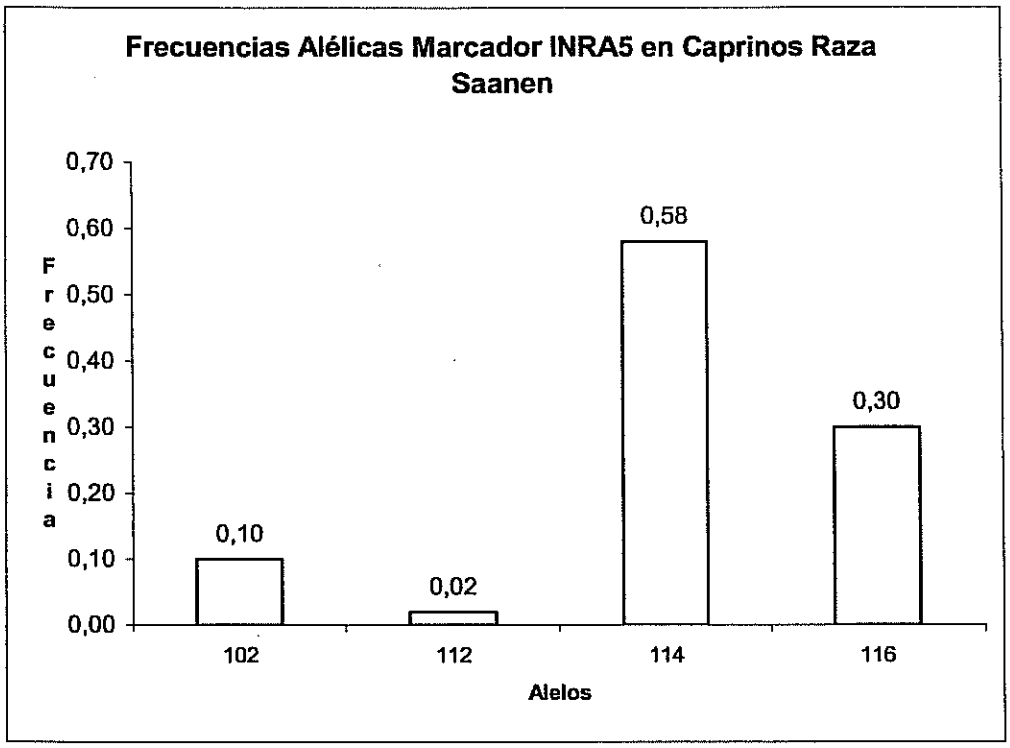

Frecuencias Alélicas Marcador ETH225 en Bovinos Holstein Frozen
Frecuencias
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,15
0,03
0,31
0,46
0,05
134
138
142
144
146
Alelos

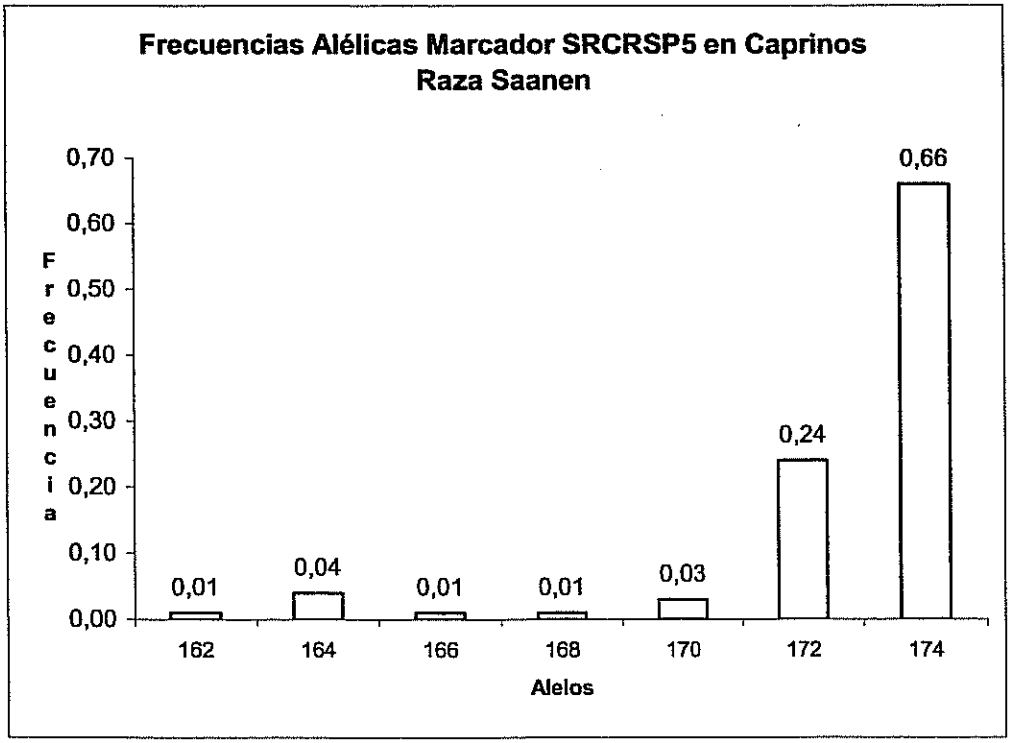

Frecuencias Alélicas Marcador BM1824 en Bovinos Holstein Frozen
Frecuencias
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,21
0,20
0,23
0,04
0,23
0,06
0,01
178
180
182
184
188
190
192
Alelos

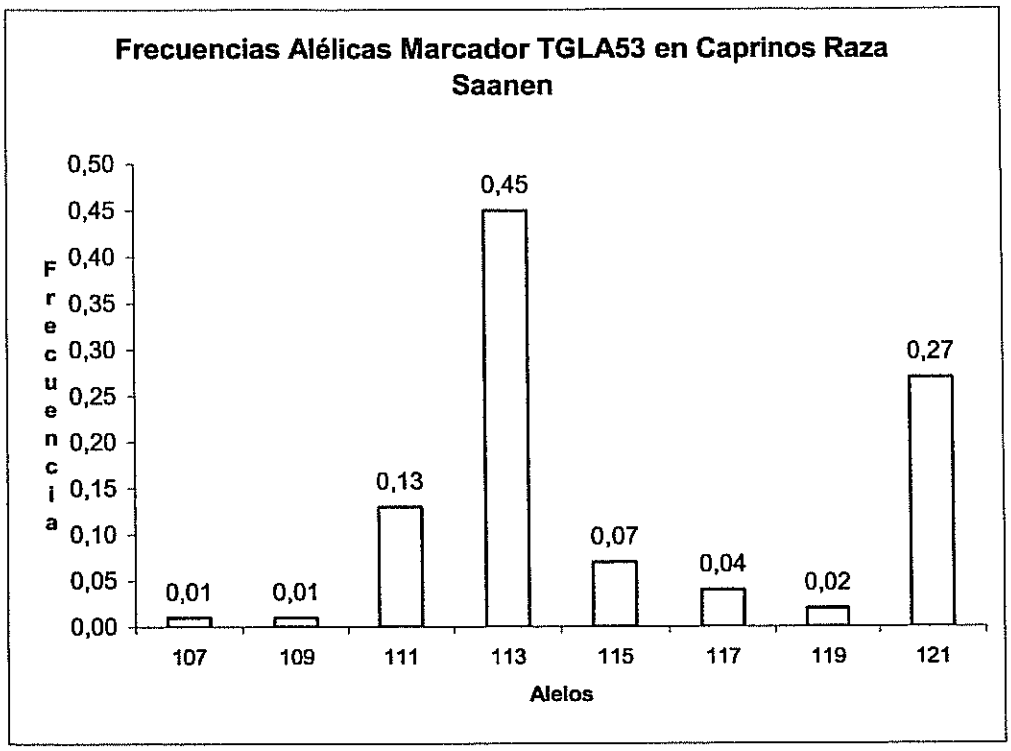
ANEXO 12: FRECUENCIAS ALELICAS DE 6 MARCADORES CAPRINOS.

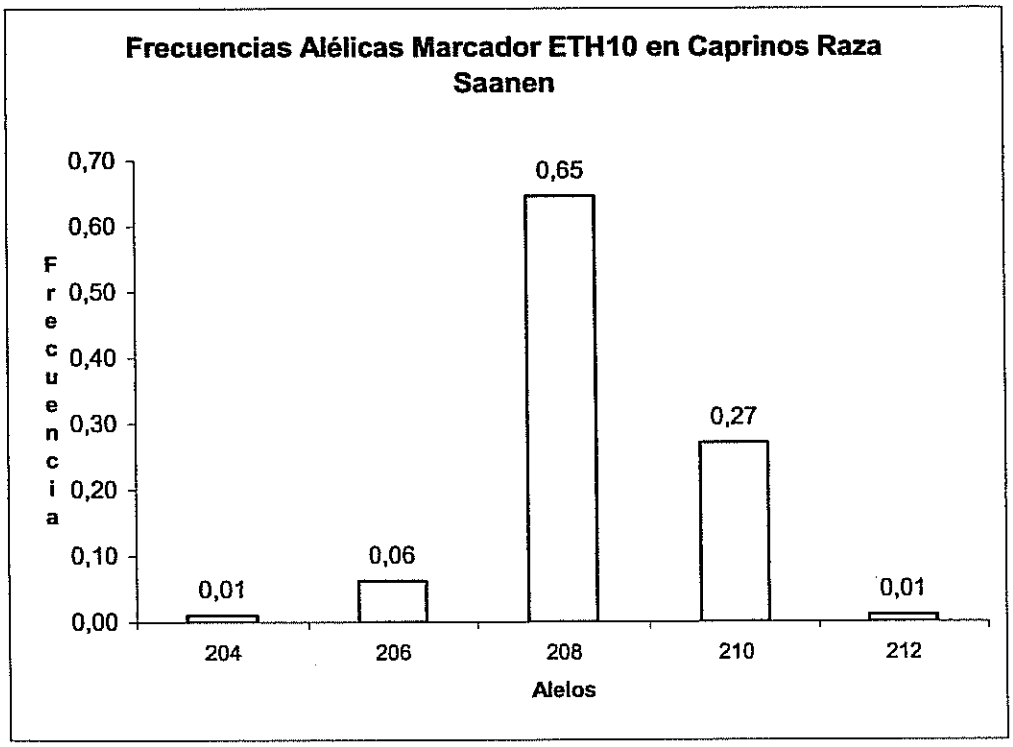





Frecuencias Alélicas Marcador INRA5 en Caprinos Raza Saanen
Frecuencia
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
0,10
0,02
0,58
0,30
102
112
114
116
Alelos

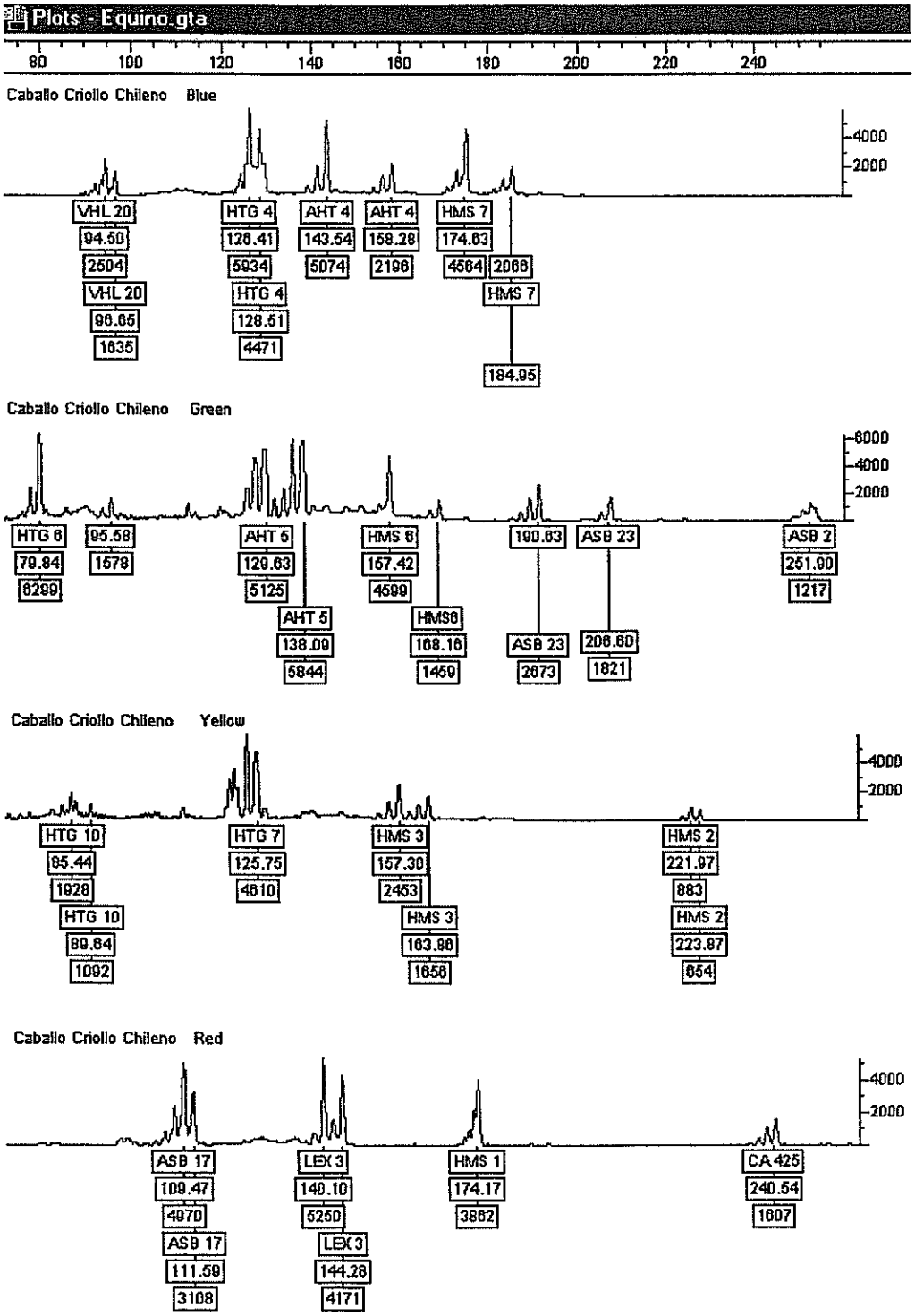

Frecuencias Alélicas Marcador SRCRSP5 en Caprinos Raza Saanen
Frecuencia
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
0,01
0,04
0,01
0,01
0,03
0,24
0,66
162
164
166
168
170
172
174
Alelos


Frecuencias Alélicas Marcador TGLA53 en Caprinos Raza Saanen
Frecuencia
0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0,01
0,01
0,13
0,45
0,07
0,04
0,02
0,27
107
109
111
113
115
117
119
121
Alelos

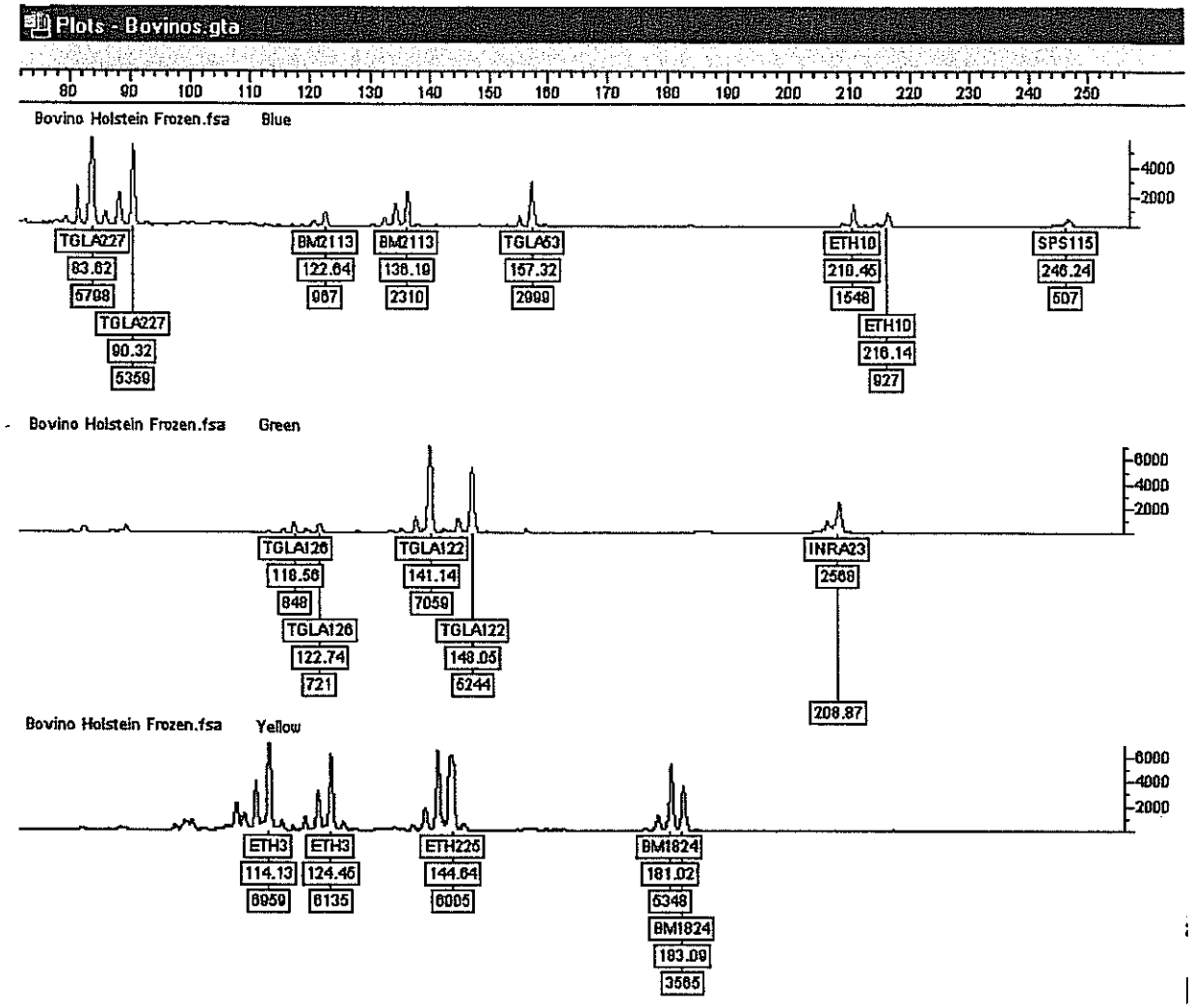

Frecuencias Alélicas Marcador ETH10 en Caprinos Raza Saanen
Frecuencia
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
0,01
0,06
0,65
0,27
0,01
204
206
208
210
212
Alelos

ANEXO 13: ELECTROFEROGRAMAS CAPRINOS, BOVINOS Y EQUINOS

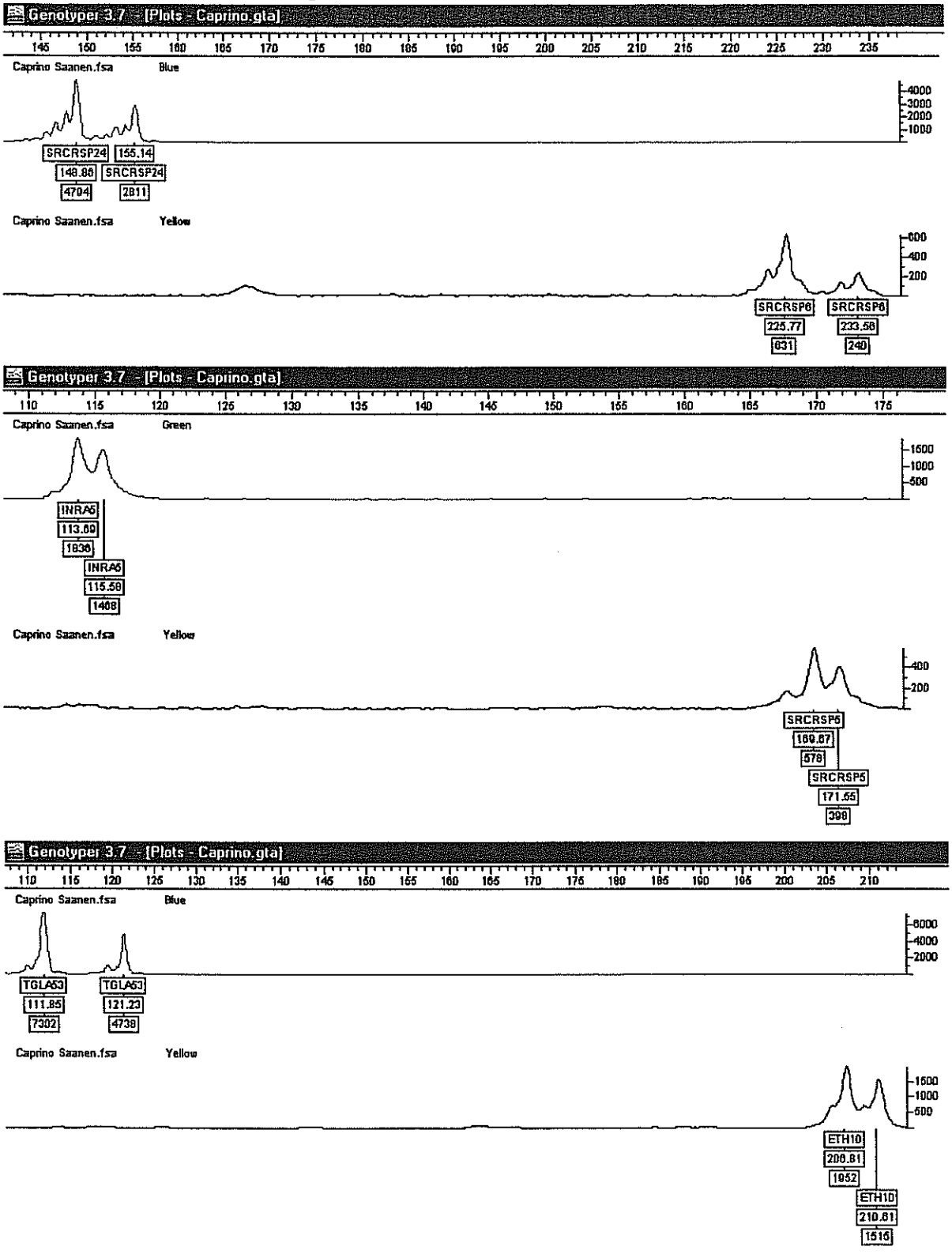
A) Electroferograma Equinos:



B) Electroferograma Bovinos:



C) Electroferograma Caprinos:



Anexo 14: CERTIFICADO DE PERFIL DE ADN Y DE PATERNIDAD.

A) Certificado de Perfil de ADN

Sociedad Nacional de Agricultura F.G.
Departamento de Ganadería
Laboratorio de ADN
Tenderini 187 - Santiago
Fono : 639 6710 Fax : 639 6227
Email : rgenealogico@sna.cl

C E R T I F I C A D O

P E R F I L D E A D N

CERTIFICADO Nº : 4.001
Nº DE REGISTRO : 181925
NOMBRE ANIMAL : "SAN DAVID" PUNTILLA
FECHA EMISION : 27 de Julio del 2005

MARCADORES	ALELOS
VHL20	LN
HTG4	LL
AHT4	FH
HMS7	JK
HTG6	DL
AHT5	HK
HMS6	LN
ASB2	LL
HTG10	HL
HTG7	MO
HMS3	QQ
HMS2	HJ

OBSERVACIONES :

SOC. NACIONAL DE AGRICULTURA LABORATORIO ADN DIRECTORIO REGISTROS GENEALOGICOS

JEFE DE REGISTROS

JOSÉ LUIS SAA
TECNÓLOGO MÉDICO
JEFE DE LABORATORIO S.N.A.

B) Certificado de Paternidad

Sociedad Nacional de Agricultura F.G.
Departamento de Ganadería
Laboratorio de ADN
Tenderini 187 - Santiago
Fono : 639 6710 Fax : 639 6227
Email : rgenealogico@sna.cl

CERTIFICADO

PATERNIDAD ADN

CERTIFICADO N° : 4.001 **FECHA : 27 de Julio del 2005**

ANIMAL : 181.925,0 "SAN DAVID" PUNTILLA
PADRE : 141.652,0 "NINQUIHUA" CHE COPETE
MADRE : 101.236,0 "HUINCANO" VERBENA

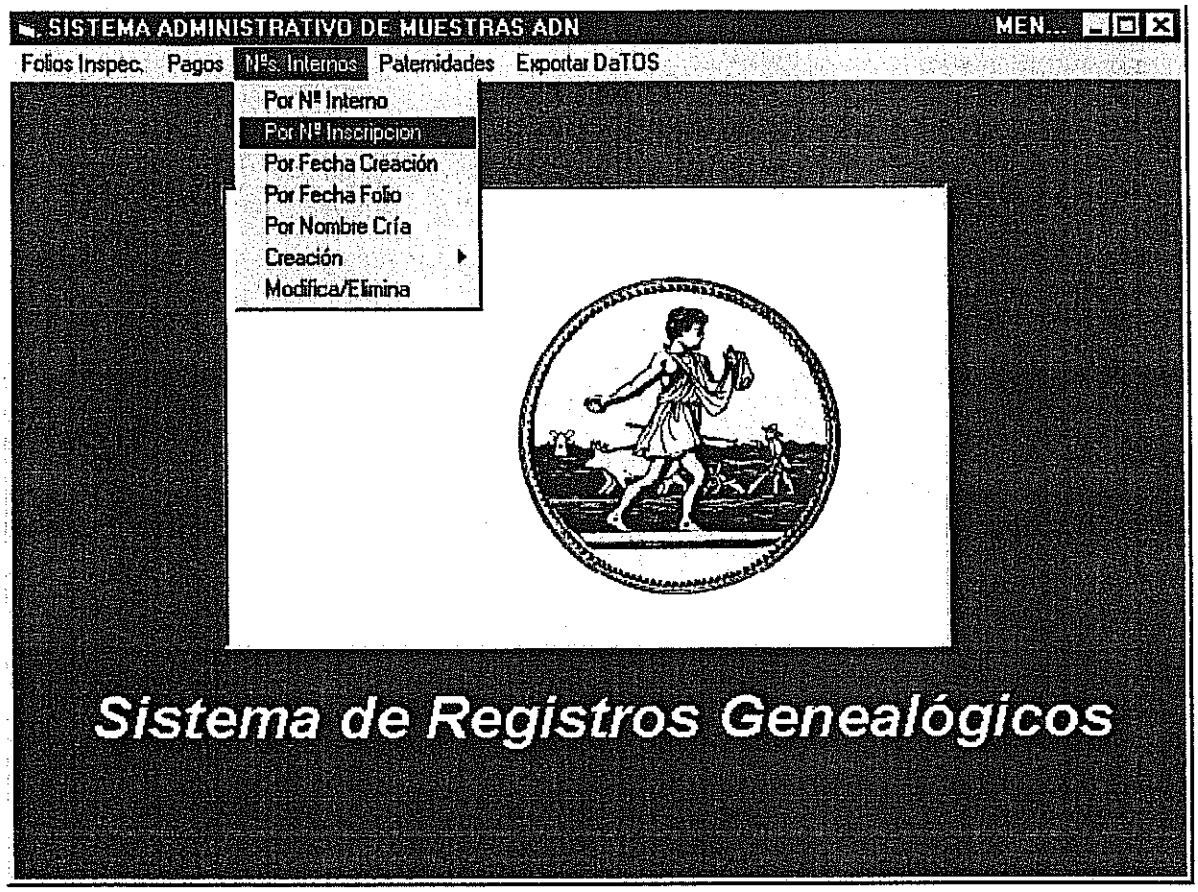
MARCADORES	PADRE	HIJO	MADRE
VHL20	LL	LN	NQ
HTG4	LL	LL	LM
AHT4	FJ	FH	FH
HMS7	JK	JK	JK
HTG6	DL	DL	LL
AHT5	HI	IK	KL
HMS6	NQ	LL	LL
ASB2	HJ	JL	JL
HTG10	HL	LL	LL
HTG7	MO	MO	OO
HMS3	QQ	QQ	QQ
HMS2	HL	HJ	HJ

RESULTADOS : **Debido a la frecuencia de los alelos amplificados compartidos entre la cría "PUNTILLA" y los presuntos padres, se confirma la maternidad y paternidad de ambos.**

OBSERVACIONES :

SOC. NACIONAL DE AGRICULTURA LABORATORIO ADN DIRECTOR

JEFE DE REGISTROS

JOSE LUIS SAA
TECNÓLOGO MÉDICO
JEFE DE LABORATORIO S.N.A.

ANEXO 15: SOFTWARE ADMINISTRATIVO DE REGISTRO GENEALÓGICO.