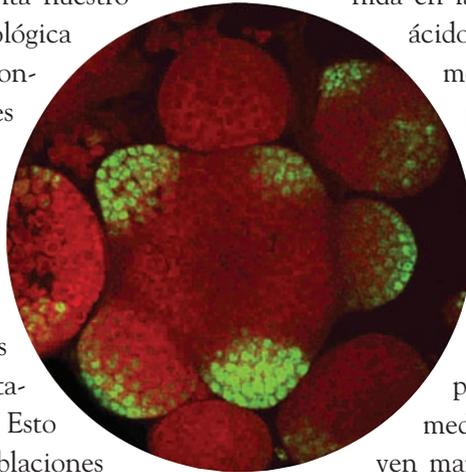


Marcadores moleculares: una REVOLUCIÓN en la ZOOLOGÍA

Evelyn Ríos, Humberto Mejía-Ruiz y
Sergio Ticul Álvarez-Castañeda

Durante muchos años, los estudios de zoología se han enfocado a describir las distintas especies de animales que han habitado la Tierra. Esta actividad de registrar “lo que hay” es de suma importancia, pues incrementa nuestro conocimiento sobre la riqueza biológica y nos permite ver qué debemos conservar y a cuáles especies se les puede dar un uso sustentable para beneficio de la sociedad. Sin embargo, en el pasado, los zoólogos sólo describían a las especies con base en sus características observables (morfológicas), las cuales ahora se sabe que pueden ser resultado de la influencia del ambiente. Esto llevó a que un gran número de poblaciones fueran consideradas como especies distintas, y que poblaciones morfológicamente similares se incluyeran dentro de una misma especie sin serlo, enmascarando la realidad.

Un ejemplo simple es el de los mamíferos, que incluyen aproximadamente a cinco mil especies y 26 órdenes. No obstante, los mastozoólogos (expertos en mamíferos) aún no logran coincidir en cuál es el número exacto de especies, ni en cuáles órdenes y familias se relacionan entre sí y cómo. En nuestros días, y a medida que se genera más información proveniente de filogenias basadas en evidencia molecular, va cambiando la manera en la que los grupos se asocian. Por ello, es de gran importancia conocer las herramientas moleculares que nos permitan obtener información más precisa sobre los organismos.



Diversidad en el ADN

El reino animal es un grupo extremadamente diverso, y esta riqueza de especies es consecuencia de variaciones en la información genética contenida en las secuencias de bases que forman el ácido desoxirribonucleico (ADN). Actualmente hay varias técnicas disponibles para analizar las diferencias entre secuencias de ADN; los datos que se obtienen se utilizan para conocer la variabilidad genética de los individuos o poblaciones.

Los *loci* (posiciones que ocupan los genes a lo largo de un cromosoma; plural del griego *locus*, lugar) analizados mediante técnicas moleculares constituyen marcas, puntos de referencia dentro del genoma, y son conocidos como marcadores moleculares. Tales marcadores son características del ADN que pueden diferenciar a dos o más individuos, y son heredables de generación en generación. Por tanto, un marcador molecular será aquel fragmento de ADN polimórfico (con variaciones) que nos permita distinguir entre diferentes grupos taxonómicos (hasta nivel de especie o subespecie), poblaciones, familias o individuos.

Características de los marcadores moleculares

Los distintos tipos de marcadores moleculares hoy disponibles pueden ser distinguidos por la tecnología que se utiliza para revelar la variabilidad del ADN. Los marcadores varían en cuanto a su capacidad

para detectar diferencias entre los individuos, sus costos de aplicación, facilidad de uso, consistencia, capacidad múltiple (evaluar varios *loci* al mismo tiempo) y de repetición.

De manera general, los marcadores genéticos se pueden clasificar en citogenéticos (cromosomas); bioquímicos (electroforesis de enzimas); y los basados en ADN, que a su vez se agrupan, según el método de identificación, en: *a*) los de clonación (obtención de fragmentos idénticos de ADN a partir de una misma secuencia original) y de secuenciación (determinación del orden de bases nucleotídicas –adenina, guanina, citosina, timina y uracilo– en fragmentos de ácidos nucleicos); y *b*) los de impresión única o huella digital genética (*fingerprinting*: utilización de pequeñas secuencias de ADN que se sabe que varían entre individuos).

Se espera que un marcador molecular sea capaz de discriminar diversos alelos (diferentes versiones de un mismo gen) de un mismo *locus*, y sea útil para detectar polimorfismos en el mayor número posible de *locus* al mismo tiempo en una única reacción.

Gran parte de los estudios que utilizan marcadores moleculares pueden ser considerados como estimaciones de la historia evolutiva de los organismos, debido a que se están evaluando las relaciones filogenéticas (de parentesco) desde diferentes niveles jerárquicos. Estas relaciones pueden valorarse desde niveles micro hasta macroevolutivos, con la siguiente escala: *a*) identidad genética, como en organismos de reproducción clonal (partenogenéticos); *b*) parentesco (parental, padres a hijos); *c*) afinidad genética dentro de un grupo local o población; *d*) diferenciación entre poblaciones o subespecies; *e*) diferenciación entre especies; y *f*) estructura filogenética en la evolución de los seres vivos.

A continuación se presenta una lista de los distintos marcadores moleculares que existen, así como su alcance en estudios zoológicos. Se usan los acrónimos en inglés, seguidos de su significado en español, ya que así son manejados en toda la literatura científica, de modo que el lector conozca a qué se refiere cada uno de ellos y, si es de su interés, pueda buscar más información al respecto.





El Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Nodo regional norte del Proyecto Mexicano del Código de Barras de la Vida (MEXVOL) en el cual, con el uso de marcadores moleculares, se pretende identificar taxonómicamente a todas las especies animales del país.

Marcadores citogenéticos

Este tipo de marcadores se limitan a un grupo de polimorfismos físicos, a causa de que se consideran principalmente el número y forma de los cromosomas (posición del centrómero y longitud de los brazos). Se evalúa también el patrón de bandeo G-C, el cual consiste en determinar, por medio de un colorante específico, dónde se encuentran altas concentraciones de guanina y citosina en la heterocromatina (el ADN densamente empaquetado que está presente durante la división celular). Mediante análisis de cromosomas se han logrado identificar zonas de contacto entre especies y casos de hibridación; se han utilizado en estudios taxonómicos, de evolución y biogeografía para observar polimorfismos dentro de una especie y para ver diferencias entre especies cercanas.

Actualmente existen técnicas citogenéticas como las llamadas FISH (hibridación *in situ* por fluorescencia) y GISH (hibridación *in situ* del genoma) en las que se hace uso de tintes para marcar regiones diferentes de ADN. Una vez teñidas las sondas (fragmentos de ADN de secuencia conocida utilizados para identificar secuencias idénticas o similares en una mezcla compleja), éstas se hibridan (aparean), asociándose por complementariedad de bases a zonas homólogas del ADN analizado. Las sondas marcadas se detectan con un anticuerpo específico, formando un conjugado. Después de varios ciclos consecutivos de rehibridación se logran diferentes colores fluorescentes, los cuales se

detectan por microscopía de fluorescencia de alta definición.

Ambas técnicas se utilizan para identificar cromosomas extraños o para detectar traslocaciones (cambios de posición de partes del cromosoma) en híbridos, lo cual no es posible con las técnicas de citogenética clásica como la tinción o el bandeo. En otros casos, pueden utilizarse para un primer acercamiento en la obtención de mapas físicos de cromosomas.

Son útiles como indicadores de

ancestría común y para la generación y el contraste de hipótesis filogenéticas.

Marcadores bioquímicos

Incluyen a las aloenzimas (variantes alélicas de un mismo gen de una enzima) que identifican polimorfismos físicos mediante las variantes estructurales de una misma enzima. Estos marcadores se basan en proteínas de diferente peso molecular o punto isoeléctrico, distinguibles en el patrón de bandas resultantes de la *electroforesis* (técnica donde moléculas de proteínas o ácidos nucleicos se desplazan dentro de un campo eléctrico de acuerdo a su peso molecular y carga eléctrica).

La expresión de estos marcadores puede depender del tejido analizado o la edad determinada en los individuos de estudio, pero la principal limitación de esta técnica está en el bajo número de *loci* y variantes alélicas detectables, además de que se requiere de un tamaño de muestra grande y de que el tejido sea fresco y conservado inmediatamente a -80 grados Celsius. Como ventaja está la expresión enzimática co-dominante (los dos alelos se expresan), de modo que se pueden diferenciar los individuos homocigotos (con alelos iguales) de los heterocigotos (con alelos distintos).

Estos marcadores han sido útiles en estudios sobre la estructura de poblaciones, al identificar los grados de polimorfismo dentro y entre poblaciones, así como para realizar análisis filogenéticos. Gran parte de estos

estudios son acompañados de análisis de cromosomas u otros datos morfológicos.

Marcadores basados en ADN

Los marcadores basados en el ADN ofrecen numerosas ventajas sobre las alternativas fenotípicas (morfológicas) convencionales, ya que son estables y pueden detectarse en cualquier tipo de tejido. No son afectados por el medio ambiente y generalmente carecen de pleiotropía (efecto de un único gen sobre varios caracteres fenotípicos) y efectos epistáticos (efecto de un gen o alelo sobre otro). La variación genética detectada por estos marcadores puede usarse para manipular rasgos, realizar mapas genómicos (identificar lugares clave sobre el genoma), aislar *loci* genéticos y evaluar la diversidad genética de poblaciones.

De los marcadores moleculares, los basados en ácidos nucleicos tienen un alcance más poderoso. Se generan mediante técnicas de impresión única, capaces de muestrear las moléculas de ácidos nucleicos ricas en información.

Estos marcadores moleculares se clasifican conforme a la metodología utilizada para identificarlos, ya sea por clonas y secuencias o por impresión única (*fingerprinting*).

a. Marcadores basados en clonas y secuencias

Esta categoría incluye a marcadores que se generan con técnicas que requieren aislar un fragmento de ADN clonado y, frecuentemente, determinar algunas de sus secuencias. Los principales marcadores moleculares bajo esta categoría son:

RFLP (polimorfismo en longitud de fragmentos obtenidos por enzimas de restricción): estos marcadores consisten de fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción (enzimas que cortan el ADN cuando se presentan ciertas secuencias específicas de bases) y transferidos a membranas de nailon y marcados radiactivamente. Esta técnica depende de la variación natural en la secuencia de ADN, producto de mutaciones puntuales (cambio de un solo nucleótido) o cambios a gran escala (inversiones, supresiones, inserciones o transposiciones de fragmentos de cromosomas). Si estas variaciones en la secuencia ocurren en regiones evolutivamente neutrales del genoma, las diferencias entre individuos se acumulan al paso de las generaciones sin estar necesariamente asociadas a cambios evidentes en el fenotipo. Para que el polimorfismo sea detectado, es necesario comparar las secuencias de nucleótidos de las hebras de ADN de individuos distintos.

Los marcadores RFLP han sido aplicados en la exploración de los patrones de colonización, biogeografía y filogenia de poblaciones, en la identificación de especies fenotípicamente muy similares y en la evaluación de la transmisión de parásitos de madre a hijo.

Microsatélites o SSR (secuencias simples repetidas): son secuencias medulares de 2 a 6 pares de bases repetidas



en tándem (de forma consecutiva) y que presentan un elevado grado de polimorfismo en función del número de repeticiones. Estas secuencias están presentes en alta densidad por todo el genoma y en gran parte de los casos deben ser identificados de *novo* en la especie a trabajar, generando *genotecas* (colecciones de bacterias con insertos del ADN del organismo).

No obstante, como paso inicial es posible realizar un análisis usando oligonucleótidos cebadores (*primers*, secuencias cortas de bases que sirven como iniciadores para la replicación de ADN) desarrollados para especies filogenéticamente cercanas a la especie de estudio. Una vez caracterizados, estos *loci* altamente polimórficos son amplificados (reproducidos en varias copias de fragmentos de ADN a partir de una hebra patrón) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De esta técnica derivan los denominados STMS (sitios con microsatélites marcados por secuencia) que constituyen la clase más polimórfica de marcadores moleculares. Los SSR han sido ampliamente utilizados en estudios de migración y estructura genética de poblaciones, aspectos demográficos y de conservación.

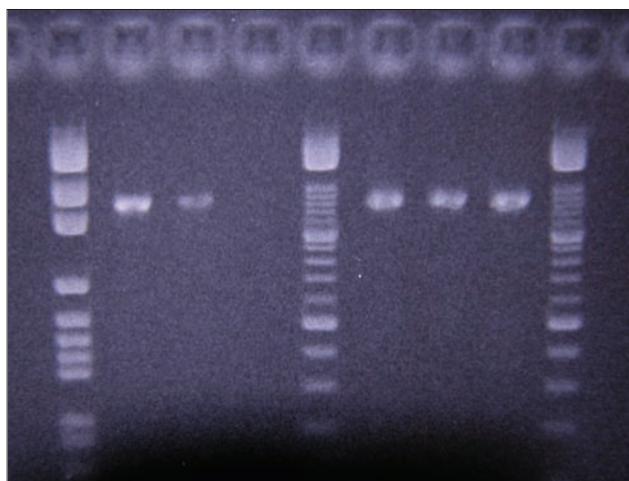
STS (secuencia de sitios etiquetados): se trata de una región de ADN de secuencia conocida que está presente una vez en el genoma haploide de una célula reproductiva. Una ventaja del marcador STS es que los extremos de la secuencia conocida pueden ser utilizados para diseñar oligonucleótidos cebadores para amplificar específicamente esa secuencia. Con estos cebadores, mediante la técnica de PCR, se podrá detectar la presencia de un particular STS en un fragmento o una mezcla de ellos. También se usan estos marcadores moleculares para identificar fragmentos de ADN clonados que contienen ciertas secuencias que se sabe que están dentro o se relacionan con un gen de interés.

EST (marcador de secuencias expresadas): son regiones de ADN expresadas, es decir, transcritas a ácido ribonucleico (ARN) mensajero. Se considera que con los EST se accede a la exploración más amplia de la porción transcrita del genoma, ya que consisten en el paso directo de la secuenciación parcial de la clona de ADN complementario (reproducción del ADN a partir de la



Personal realizando técnicas de laboratorio.

Los marcadores RFLP han sido aplicados en la exploración de los patrones de colonización, biogeografía y filogenia de poblaciones, en la identificación de especies fenotípicamente muy similares y en la evaluación de la transmisión de parásitos de madre a hijo.



Identificación de *Heterodera avenae* mediante el uso de procedimientos PCR-RFLP en la población de Oregon. Imagen tomada de cbarc.aes.oregonstate.edu/cbarc/ccnphotos.php

“hembra” del ARN mensajero). Estos marcadores se han convertido en una herramienta indispensable para identificar genes expresados y para el mapeo geonómico (ubicación de genes a lo largo de los cromosomas).

SSCP (polimorfismos conformacionales de cadena sencilla): se incluyen entre las técnicas de secuenciación; su característica es separar ácidos nucleicos de cadena sencilla que tienen distinta secuencia. Pueden detectarse diferencias de una sola base, ya que alteran la estructura secundaria de la cadena de ADN y son visibles al analizarlos por electroforesis. Las mutaciones en los nucleótidos conducen a cambios en la movilidad del ADN a través del gel de electroforesis. Los SSCP son muy utilizados en la identificación de genotipos de individuos que difieren en su secuencia de ADN. Una vez que la totalidad de los alelos presentes en la población ha sido identificada y se conocen sus secuencias, es posible analizar dichos alelos y asignarles una distancia de corrida específica. Posteriormente, estos mismos genotipos pueden ser determinados en individuos sin necesidad de recurrir a las técnicas de clonado y secuenciación. Esta técnica resulta ser de fácil implementación y de menor costo que las prácticas de secuenciación convencionales.

Los SSCP han sido aplicados en estudios para elucidar los patrones de diversidad genética a lo largo de la distribución de las especies, principalmente de aquellas en peligro de extinción.



La identificación de especies se complementa con la evaluación de caracteres morfológicos y el uso de los marcadores moleculares.



Preparación de reactivos para las distintas técnicas moleculares.

SNP (polimorfismo de un solo nucleótido): es una de las más recientes clases de marcadores moleculares, y representa el más amplio tipo de variación de secuencia dentro del genoma. Consiste en el análisis comparativo de un mismo fragmento de ADN en varios individuos, de modo que los marcadores SNP se identifican al localizar las sustituciones de bases dentro de la secuencia.

Para esta técnica, se requiere obtener la secuencia total de bases del fragmento de ADN de interés para cada individuo a evaluar. Las secuencias se comparan entre sí para ubicar los sitios polimórficos. Este marcador puede ser aplicado en el análisis de genes de herencia biparental y en el análisis de diferencias genéticas entre subespecies. Se espera un incremento muy fuerte en el uso de esta técnica en los próximos años, debido a su potencial para revelar la historia evolutiva de las poblaciones, y hacer análisis de especiación y demografía histórica.

b. Marcadores basados en impresiones únicas (*fingerprinting*)

Los marcadores de este tipo no requieren conocer *a priori* la secuencia de la región polimórfica, ni aislar un ADN clonado. Entre ellos están:

RAPD (amplificación aleatoria de sitios polimórficos): consiste en la utilización de cebadores (*primers*) de se-

cuencia arbitraria para dirigir una reacción de ampli-ficación en lugares específicos del genoma, lo cual genera bandas amplificadas de diversos tamaños.

Una característica de estos marcadores es su domi-nancia, debido a que los alelos de un mismo *locus* son revelados por la presencia o ausencia de una banda. Sin embargo, no existe la posibilidad de saber si ese *locus* amplificado es homo o heterocigótico. Las venta-jas del método son su simplicidad y bajo costo; como desventaja, está la dificultad de repetir resultados ob-tenidos, ya que requiere de gran pericia en el labora-torio para lograr reproducirlos. Por ello, cada vez son menos utilizados.

Los RAPD han servido como marcadores heredables para estimar la estructura y diversidad genética, en estudios de paternidad, en la diferenciación de espe-cies muy similares y para inferir filogenias.

Minisatélites o VNTR (número variable de repeticiones asociadas): son secuencias cortas, típicamente de 10 a

60 bases, repetidas conjuntamente en número varia-ble en uno o más lugares del genoma. Un *locus* hiper-variable llega a tener la secuencia repetida hasta 50 veces, formando un sitio altamente polimórfico. Los minisatélites se obtienen a partir de un proceso de digestión del ADN por enzimas de restricción, separa-ción por electroforesis, transferencia a membranas e hibridación con sondas marcadas radiactivamente. Una posible desventaja para el desarrollo de esta téc-nica es el requerimiento de muestras con ADN de alta calidad; aquellas con ADN parcialmente degradado no son útiles.

Los minisatélites han sido utilizados para identifi-car linajes paternos en individuos y para evaluar la diversidad genética en poblaciones.

AFLP (polimorfismo de fragmentos obtenidos por amplifi-cación): consiste en la amplificación de fragmentos genómicos digeridos con enzimas de restricción, recu-riendo al uso de cebadores de diseño aleatorio, de



En especies animales de tamaño diminuto se requiere del uso de microscopía electrónica para observar su fenotipo; sin embargo, todos los marcadores moleculares se ocupan para cualquier tamaño de organismo que se quiera estudiar.

manera que se reconocen secuencias anónimas dispersas a lo largo de todo el genoma. Al igual que RAPD y AFLP, son marcadores que detectan dominancia. Estos marcadores han servido para evaluar estructura genética y relaciones filogenéticas.

RLGS (búsqueda por restricción a partir de una marca geonómica): se basa en el concepto del uso de enzimas de restricción como puntos de referencia y generado mediante electroforesis de gel dimensional, utilizado en la comparación de patrones de ADN. Es un método útil para el análisis genómico aplicado en la construcción de mapas físicos para la detección de mutaciones en células. Este método tiene como ventajas la capacidad de exploración que permite detectar miles de puntos de referencia en un solo perfil.

Aplicación y futuro

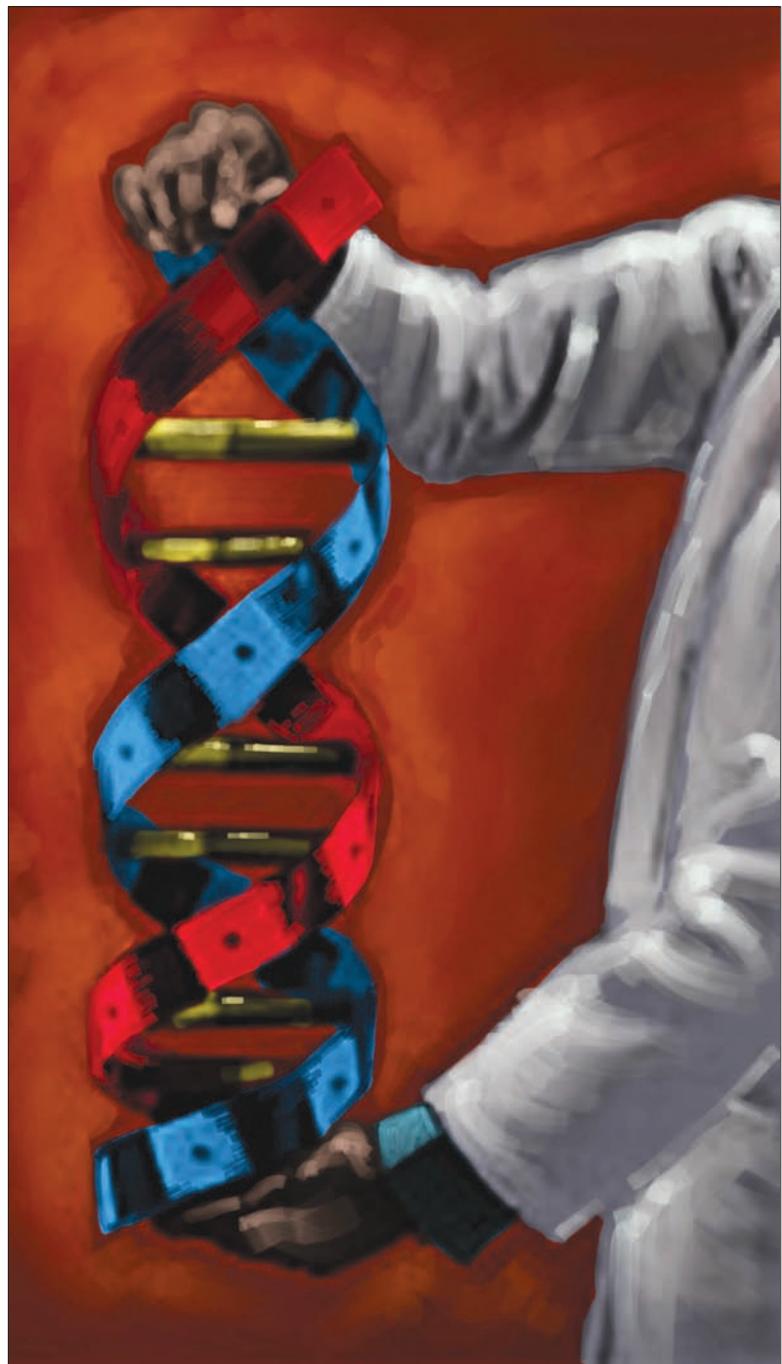
Actualmente se cuenta con diversos marcadores que se han derivado de los presentados aquí, todo con la finalidad de hacer más sencilla la evaluación de la información genética.

No se puede determinar que cierto marcador sea mejor que otro; todo dependerá del tipo de estudio que se quiera realizar. Los marcadores moleculares pueden ser aplicados a cualquier ser vivo; la diferencia radical consistirá en el método de extracción del material genético de la célula. Una vez obtenido, considerando que el material sea de buena calidad (no desnaturalizado), las técnicas a seguir para evidenciar polimorfismo serán las mismas para cualquier especie que se quiera estudiar.

En México son numerosos los laboratorios que cuentan con el equipo y la tecnología necesarios para llevar al cabo estudios con marcadores moleculares. Prácticamente cada centro de investigación, instituto o universidad cuenta al menos con un laboratorio enfocado en investigación en genética y biología molecular, con personal capacitado para tales actividades. Y debido a que las técnicas se han vuelto cada vez más simples, su aplicación resulta de fácil acceso, tanto en material y equipo como en lo económico.

Gracias al desarrollo de los marcadores moleculares se ha conseguido conocer más sobre la biodiversidad

que nos rodea. Por ello, la evaluación del genoma de los organismos ha revolucionado enormemente los estudios de zoología. En la actualidad ya se cuenta con herramientas más precisas con las que se ha logrado distinguir especies, identificar híbridos, ver parentesco entre individuos, conocer problemas de endogamia y cuellos de botella, definir especies que requieren de estrategias para su conservación, así como reconocer



aquellas a las que se les puede dar una explotación racional.

Todo esto no hubiera sido posible sin la ayuda de la tecnología molecular; no bastaba con la evaluación de los caracteres morfológicos. No obstante, dentro de la zoología, una aproximación no excluye a la otra, sino más bien se complementan. La evaluación morfológica de los organismos aún sigue siendo de gran importancia para entender la biología y diversificación de las especies, pero los estudios se han enriquecido al incluir estimaciones de su variación genética.

Hasta el momento no hemos conseguido explorar todos los rincones de nuestro planeta, por lo que faltan muchas formas de vida por descubrir. A medida que avance la tecnología será más fácil acceder a ellos, y con la generación de nuevas herramientas como los marcadores moleculares podremos tener pronto un inventario confiable.

Bibliografía

- Awise, John C. (1994), *Molecular markers, natural history and evolution*, EUA, Chapman & Hall.
- Caetano-Anollés, Gustavo y P. M. Gresshoff (compiladores, 1997), *DNA markers: protocols, applications and overviews*, EUA, John Wiley & Sons.
- Hillis, David M., C. Moritz y B. K. Mable (compiladores, 1996) *Molecular systematics*, 2a. edición, EUA, Sinauer Associates.
- Schlötterer, C. (2004), "The evolution of molecular markers – just a matter fashion?", *Nature reviews genetics*, 5, 63-69.
- Smith, Thomas B. y R. K. Wayne (compiladores, 1996), *Molecular genetic approaches in conservation*, EUA, Oxford University Press.

Sitios web de interés

- Laboratorio de Marcadores Moleculares en Plantas y Hongos Cinvestav-Unidad Irapuato:
www.ira.cinvestav.mx/pp_esp/genetica/jsj/jsj.pdf
- International Plant Genetic Resources Institute:
www.ipgri.cgiar.org/Training/Unit10-1/MolMarkers_es/
- Tecnociencia: la importancia de la biotecnología:
www.tecnociencia.es/especiales/transgenicos/2.htm



Científicos realizando investigación con especies animales acuáticas.

Evelyn Ríos es bióloga egresada de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)-Iztacala; obtuvo su maestría y doctorado en ciencias en el uso, manejo y preservación de los recursos naturales, en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), en La Paz, Baja California Sur, en donde actualmente colabora en distintos proyectos de investigación. Ha participado en 12 publicaciones científicas y diversos congresos nacionales e internacionales. Sus intereses de investigación están orientados hacia la sistemática, filogeografía y genética de poblaciones de mamíferos.

everios04@cibnor.mx

Claudio Humberto Mejía-Ruiz estudió biología en la Escuela Superior de Biología de la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED); realizó sus estudios de maestría y doctorado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Después de realizar sus estudios de postgrado se incorporó al CIBNOR, en Baja California Sur, donde actualmente aplica las herramientas de la biología molecular en apoyo a áreas afines y desarrolla estrategias moleculares para combatir enfermedades del camarón.

hmejia04@cibnor.mx

Sergio Ticul Álvarez-Castañeda es biólogo egresado de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, con doctorado en la UNAM. Actualmente está adscrito al CIBNOR, donde es responsable del nodo regional del Proyecto Mexicano del Código de Barras de la Vida (MexBOL). Ha participado en varios proyectos y congresos con más de 100 publicaciones científicas en diferentes aspectos sobre mamíferos.

sticul@cibnor.mx