The background of the slide is a photograph of a desk. In the top left corner, there is a desk lamp with a blue shade. The desk surface is covered with a white sheet of paper that has some faint, illegible text and diagrams. A blue ruler is placed horizontally across the middle of the page. A red and white marker is lying on the desk in the bottom right corner. The overall scene is lit from the left, creating a soft shadow of the lamp on the desk.

Avances en la aplicación de la Genómica y la Biotecnología Animal en el Perú

Ricardo Fujita, Ph.D.
Centro de Genética y Biología Molecular
U. San Martín de Porres

1era Conferencia Nacional de Biotecnología
Auditorio CC Ccori Huasi-URP
12 mayo 2009



¿Porqué Biotecnología en animales?

- Mejoramiento Genético Productivo (seleccionar del pool genético o introducir genes)
- Evaluación de Biodiversidad (riqueza/erosión)
- Monitoreo de poblaciones (flujo geográfico, temporal)
- Protección a enfermedades
- Obtención de productos (proteínas recombinantes, biopharming)
- Modelos animales, animales “humanizados”
- Etc.



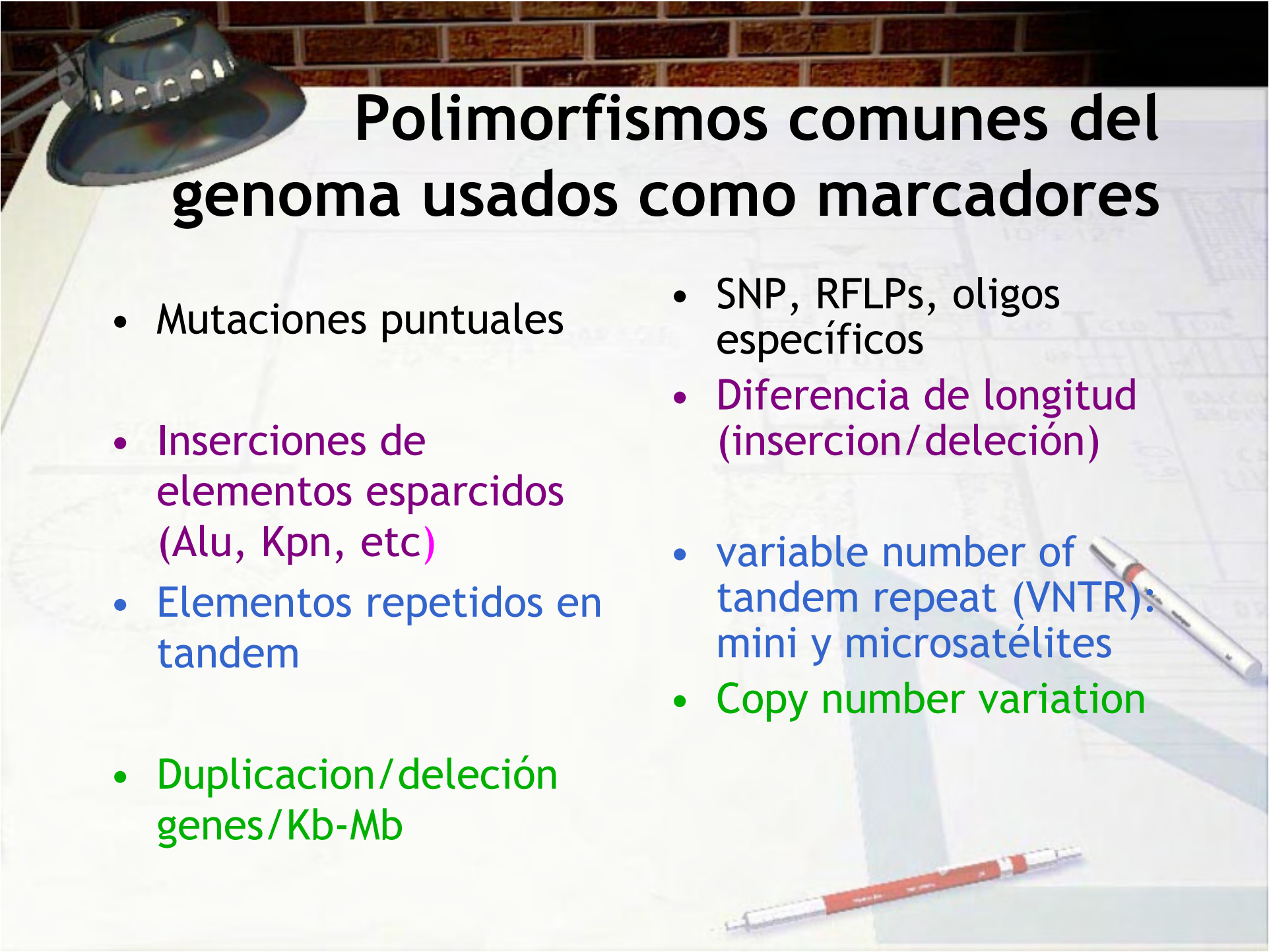
Mejoramiento Genético Productivo

- Bases hereditarias del fenotipo: genes estructurales y reguladores
- Fibra
- Carne
- Leche
- Huevo
- Cuero
- Inmunidad
- Etc.



Mejoramiento Genético Molecular

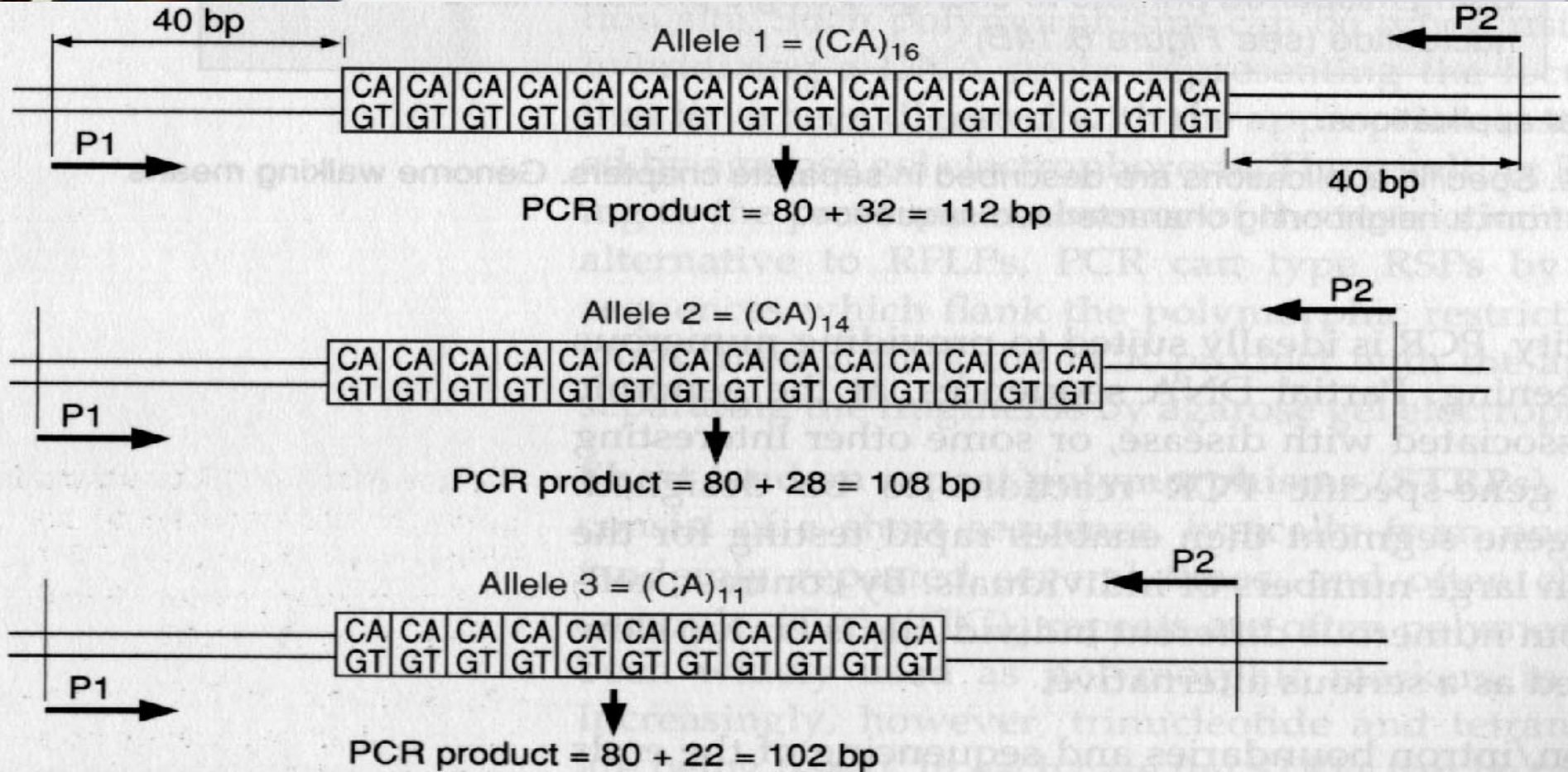
- Mejoramiento en menos generaciones vs. tradicional
- Generación de marcadores
- Identificación de genes: mapa genético, QTLs
- Iniciativas genoma millonarios:
 - Ganado
 - Peces cultivados
 - Perros
 - Aves de corral



Polimorfismos comunes del genoma usados como marcadores

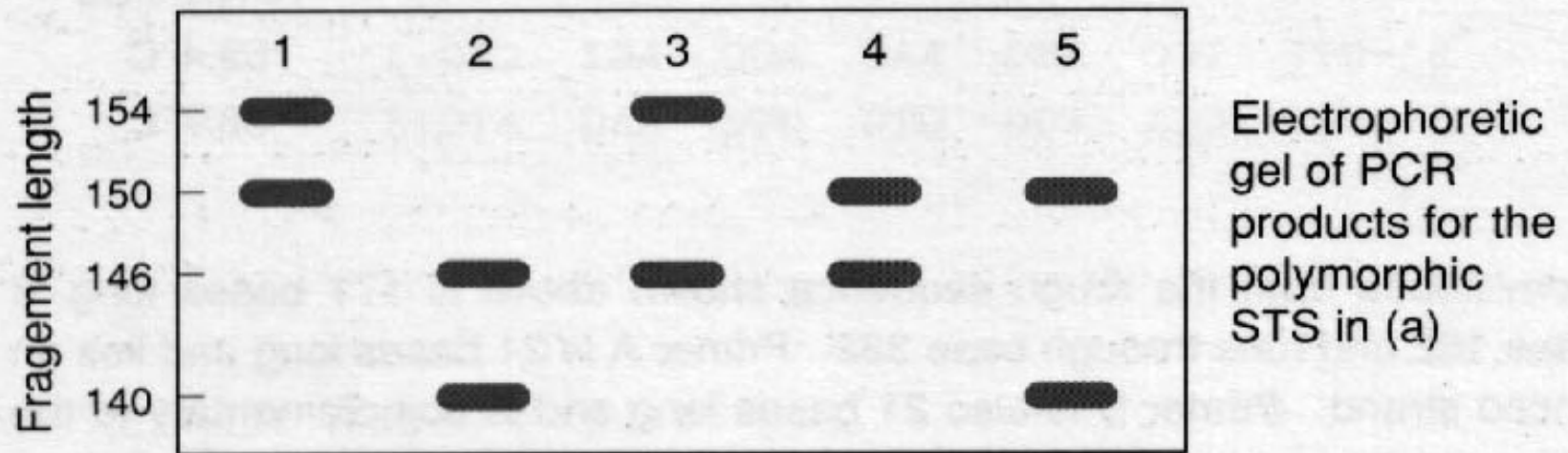
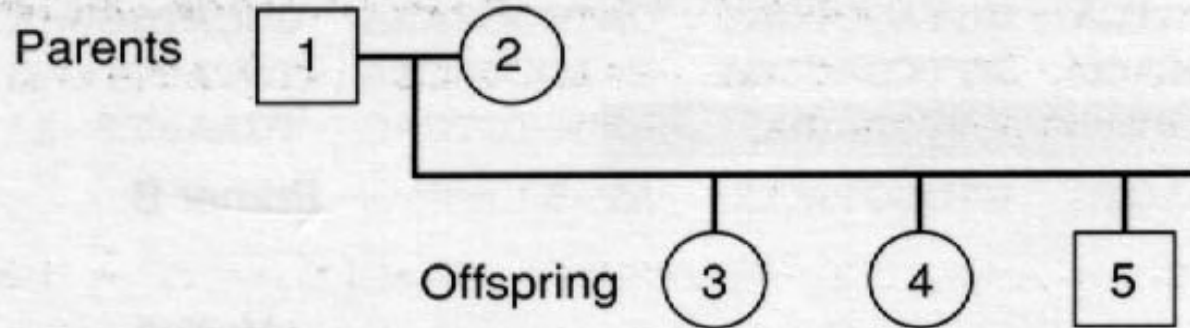
- Mutaciones puntuales
- Inserciones de elementos esparcidos (Alu, Kpn, etc)
- Elementos repetidos en tandem
- Duplicación/delección genes/Kb-Mb
- SNP, RFLPs, oligos específicos
- Diferencia de longitud (inserción/delección)
- variable number of tandem repeat (VNTR): mini y microsatélites
- Copy number variation

Esquema de un microsatélite



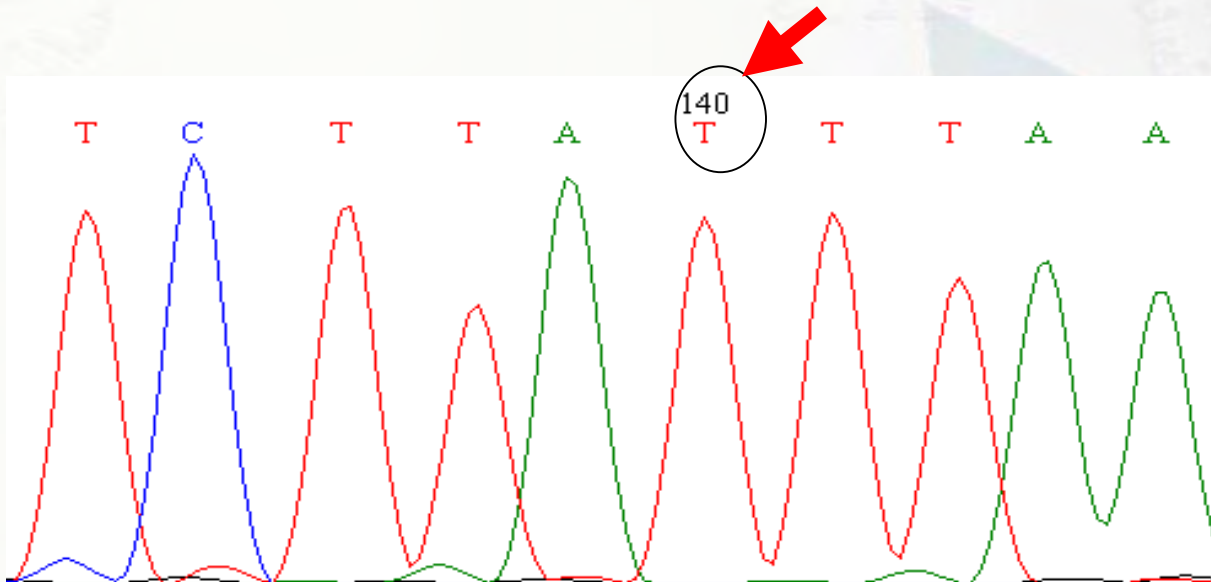
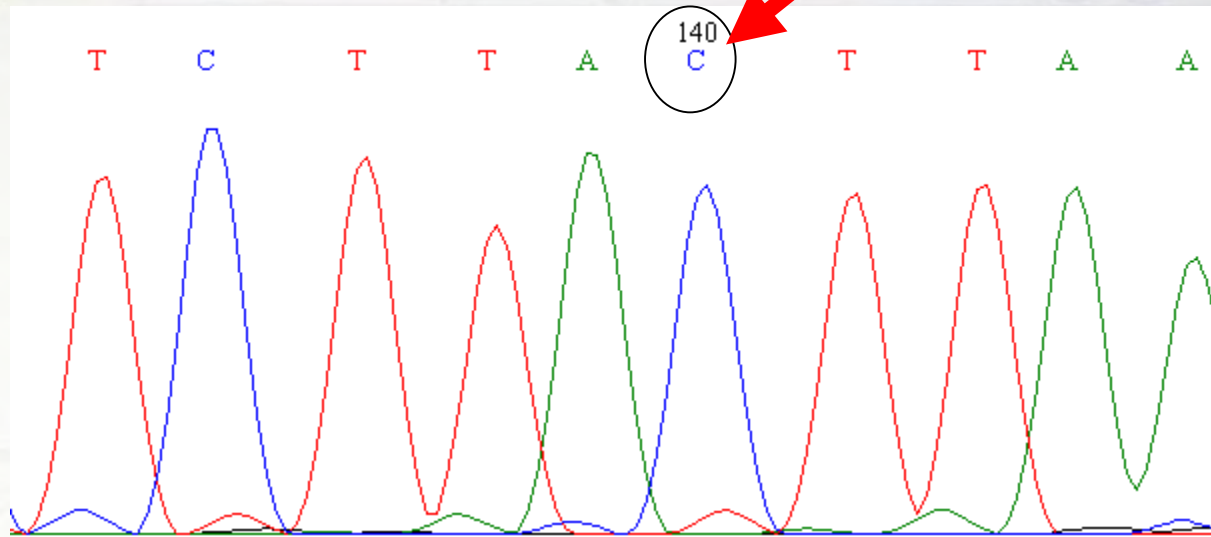
La región flanqueante (P) es idéntica en todos los cromosomas , útiles para mapeo de genes de la especie, el número de unidades del tandem es variable y heredado

marcador polimórfico microsatélite



Cada individuo recibe un alelo de cada progenitor/pruebas de identidad genética

Marcador SNP : C131T



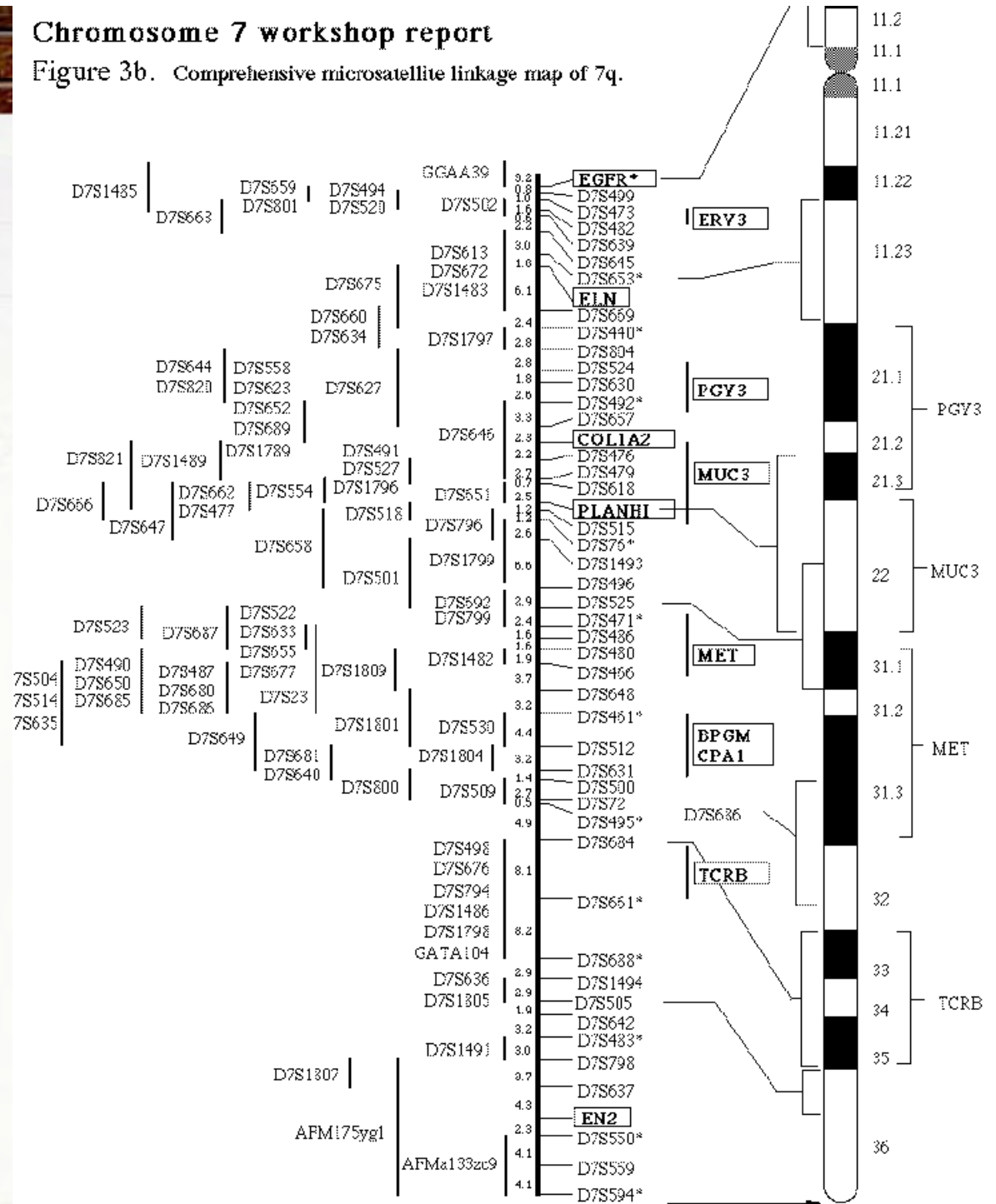


Marcadores y genes en el brazo largo del crom. 7 humano

Uno de los primeros pasos del Estudio de genomas: Generar marcadores en todas las regiones cromosómicas e identificar genes vecinos

Chromosome 7 workshop report

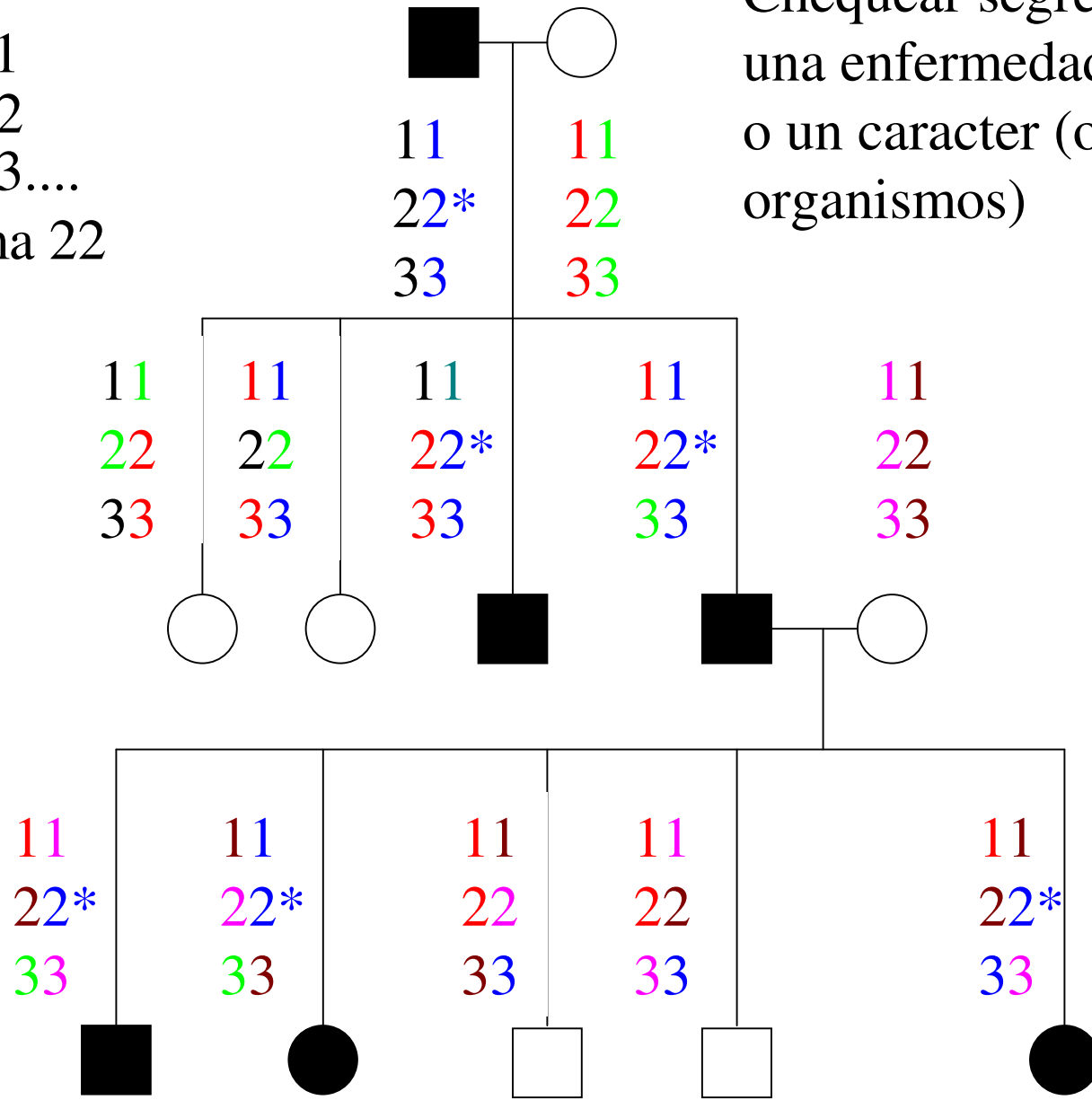
Figure 3b. Comprehensive microsatellite linkage map of 7q.



Marcadores

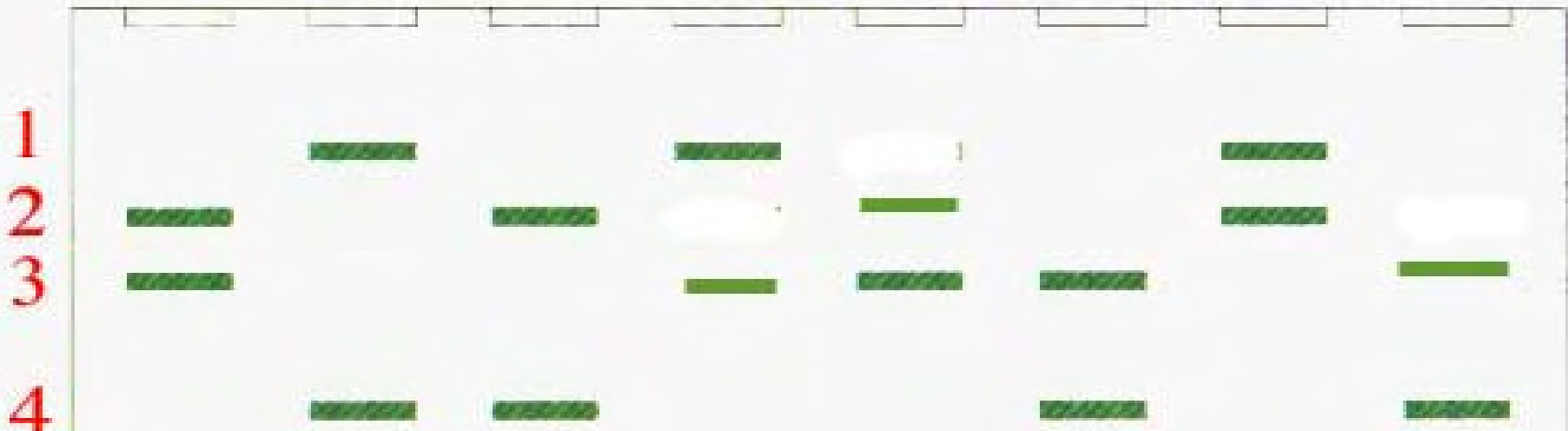
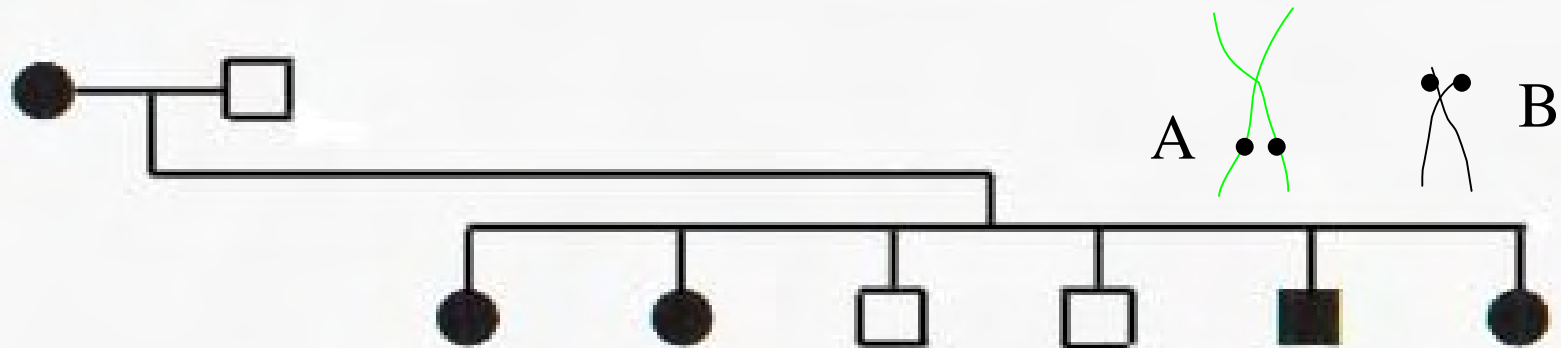
- Cromosoma 1
- Cromosoma 2
- Cromosoma 3....
- ...Cromosoma 22

Chequear segregación de una enfermedad (humanos) o un caracter (otros organismos)



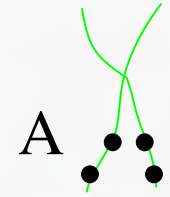
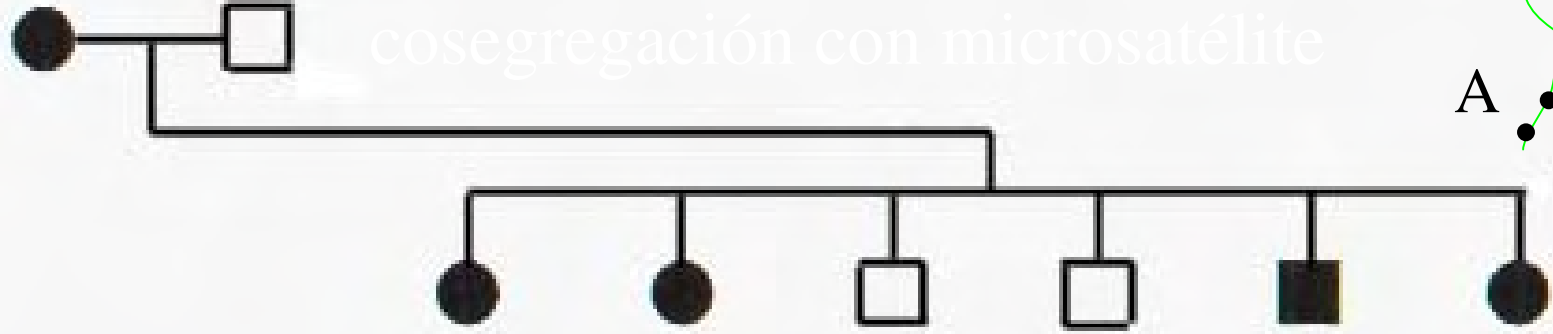
Mapeo Genético (Ligación)

Ensayo de localización de un gen (fallida)



Microsatelite del cromosoma A y una enfermedad autosómica dominante del B. Microsatelite que NO cosegrega con una enfermedad autosómica dominante (> 99% de veces). 2da ley de Mendel.


Localización exitosa de un gen por cosegregación con microsatélite



2-3 1-4 2-4 1-2 1-3 3-4 1-2 2-4



Microsatélite del cromosoma A cosegregando con una enfermedad autosómica dominante del cromosoma A. Gen ligado a marcador de cromosoma 3, puede tardar años



Quantitative Trait Loci (QTL)

- Mayor parte de características son multifactoriales: poligénicas + medio ambiente, alimentación, sanidad, etc.
- Hay decenas de marcadores en cada región cromosómica
- Microsatélites vecinos a una variante de un gen pueden servir como “post-its” de una característica => **mayor frecuencia de un alelo asociado a una característica estudiada**



Evaluación de la diversidad genética

- Posibilidades de sobrevivencia de las poblaciones depende de su diversidad
- Poca diversidad (cosanguinidad): Grupos naturales en riesgo de extinción. Cultivo: problemas de tamaño, infecciones, etc.
- Manejo racional: evitar la erosión genética (pérdida de variabilidad)
- Estudio de marcadores genéticos permiten evaluar la diversidad de la población

Universalidad de los organismos

- Información hereditaria: DNA con 4 nucleótidos, proteínas con aa
- Procesos conservados: replicación, transcripción, traducción
- Genes conservados: Receptores, canales, segundos mensajeros, secuencias regulatorias, etc.
- Modelos de otros organismos





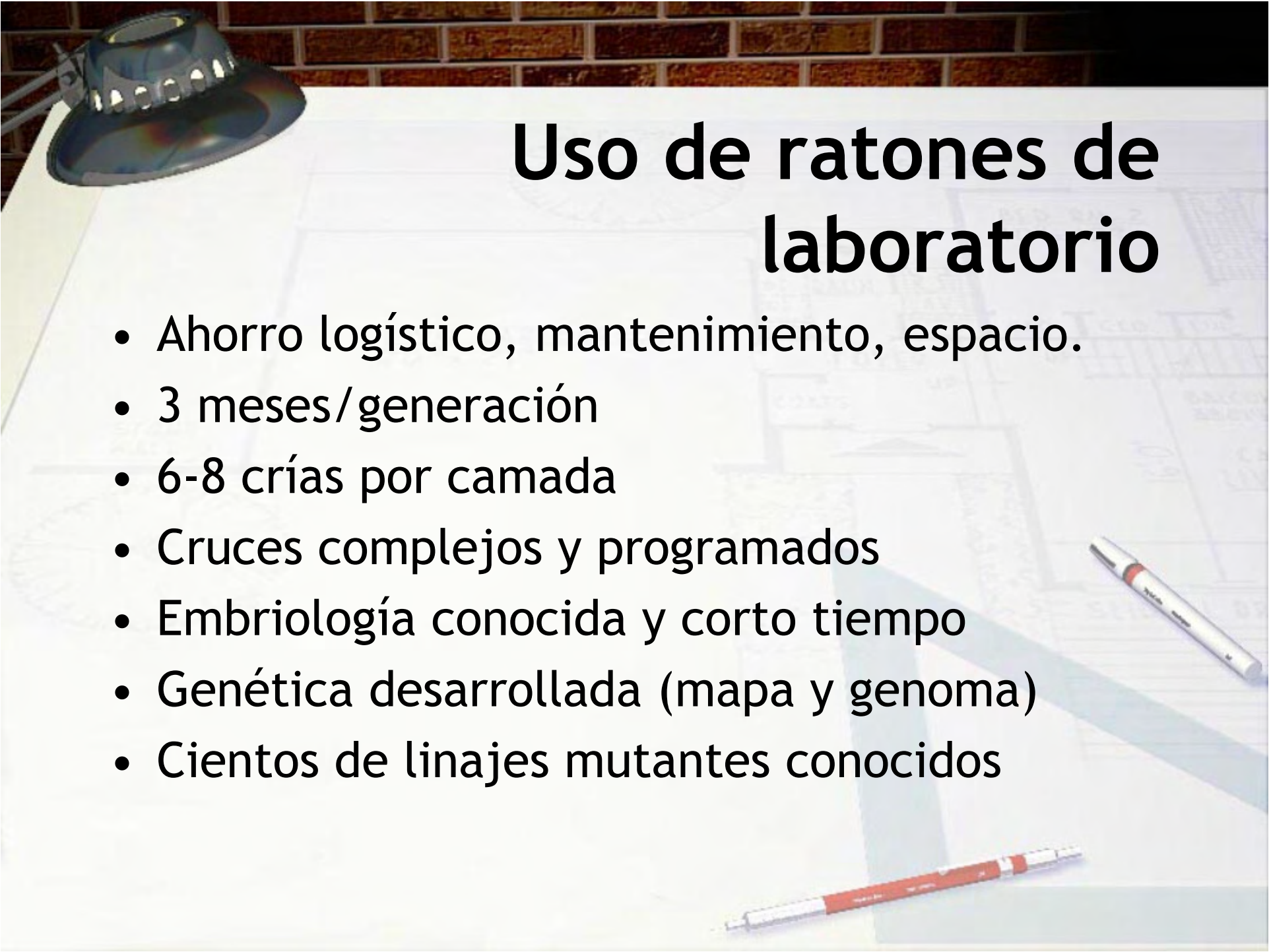
Mutaciones en c-KIT en 2 especies



The background of the slide is a photograph of a desk. In the top left corner, there is a desk lamp with a glass shade. The desk surface is covered with a white sheet of paper that has some faint, illegible markings and a ruler. Two markers, one red and one silver, are lying on the paper. The background wall is made of red bricks.

Modelos Animales

- Experimentación: planarias, Drosophila, anfibios, peces, mamíferos.
- Estructura y fisiología común en mamíferos: hígado, páncreas, corazón(4), placenta, etc.
- Regulación de la expresión genética similar




Uso de ratones de laboratorio

- Ahorro logístico, mantenimiento, espacio.
- 3 meses/generación
- 6-8 crías por camada
- Cruces complejos y programados
- Embriología conocida y corto tiempo
- Genética desarrollada (mapa y genoma)
- Cientos de linajes mutantes conocidos



Mutantes espontáneos

- Mutaciones al azar
- Investigadores han reconocido fenotipo
- Ejemplos:
 - Bedlington terriers
 - Ratas Long Evans Cinnamon (LEC)
 - Ratón toxic milk
 - Rata Gunn



Modelos animales biotecnológicos

- Mutaciones provocadas/ing. Genética
- Seguimiento expresión desde embrión a adulto
- Transgénicos; introducción de genes humanos, de otros animales o autólogos
- “Genes Noqueados”: inactivación selectiva de genes.
- Cerdos con “antígenos humanizados”, fuente de órganos para transplante.



Obtención de productos

- Proteínas humanas en animales
- Leche vacas, ovejas y cabras: lactoferrina, HGF, Factores VIII, IX
- Huevo de gallinas: anticuerpos humanos
- Sangre de porcino; albúmina
- Semen
- Seda
- Orina



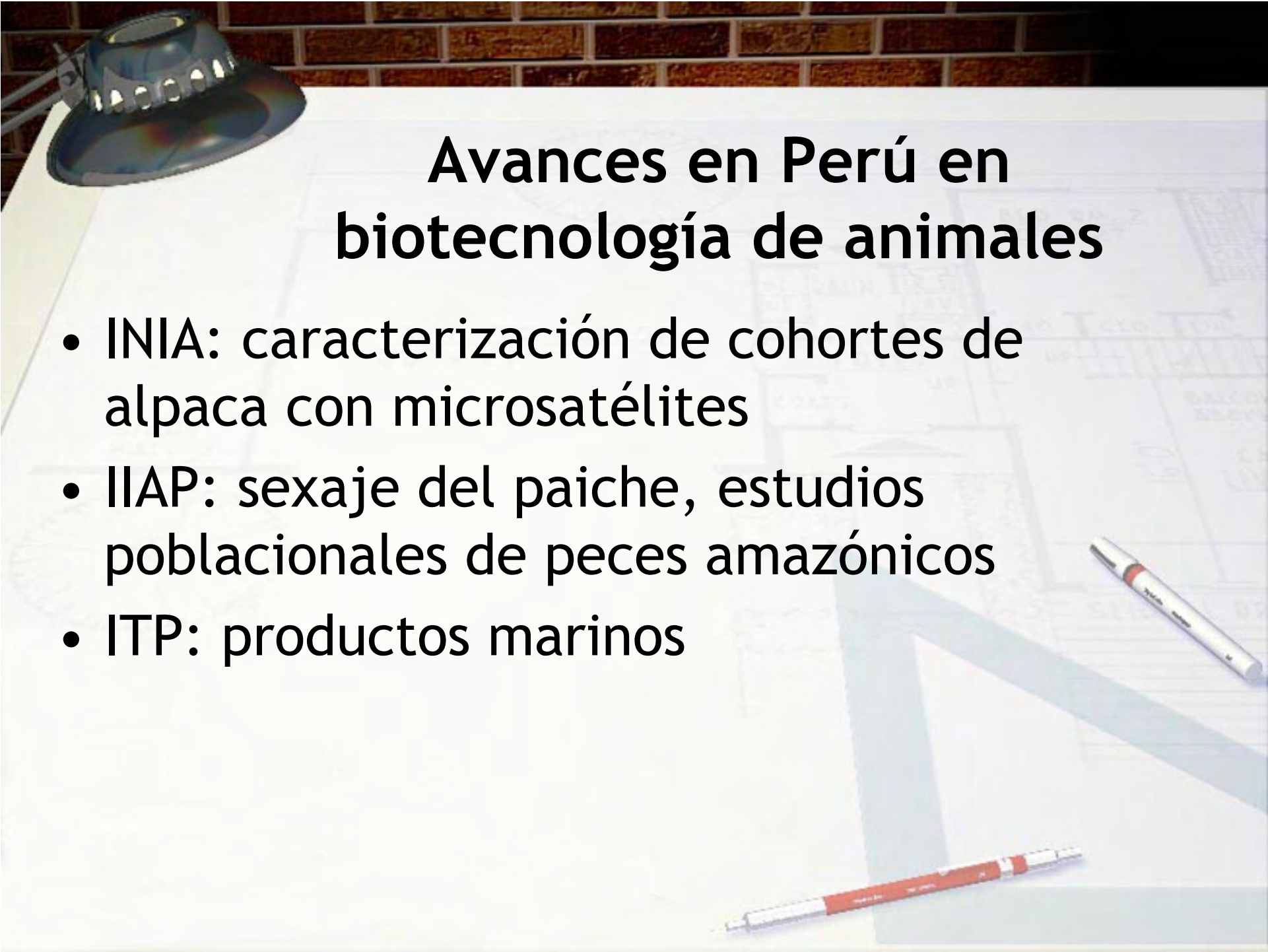
Proteínas Recombinantes

Proteínas terapéuticas

Producto	Enfermedad a tratar
Insulina	<i>Diabetes mellitus</i>
Hormona del crecimiento	Enanismo pituitario
Tissue plasminogen activator	Infarto agudo al miocardio
α -interferón	Leucemia mieloide crónica, Kasposi (SIDA)
β -interferón	Esclerosis múltiple (pruebas)
γ -interferón	Agente antitumoral
Eritropoyetina	Anemia en pacientes con renal failure
Factor estimulante de granulocitos	Sepsis / neutropenia
Factor estimulante de granulocitos-macrofagos	Transplante de médula autóloga (después de c
Factor VIII	Hemofilia A
Factor IX	Hemofilia B
Interleukinas	Inmunodeficiencias, cancer

Miles de millones de dólares






Avances en Perú en biotecnología de animales

- INIA: caracterización de cohortes de alpaca con microsatélites
- IIAP: sexaje del paiche, estudios poblacionales de peces amazónicos
- ITP: productos marinos



Avances...

- UNMSM: Raúl Rosadio y Jane Wheeler: enfermedades de camélidos, estudios poblacionales y evolutivos. Genética y Genómica
- UNALM: William Vivanco: transferencia de embriones
- UNFV: Susana Sirvas: nutrición de peces, marcadores en concha de abanico



Cayetano Heredia

- Armando Hung: resistencia a parásitos en alpacas. Biotecnología.
- Patricia Herrera: protección a enfermedades infecciosas de alpacas, vacunas. Biotecnología
- José Espinoza: caracterización de cohortes de alpacas, búsqueda de genes y marcadores. Genética y Genómica.
- Mancha blanca en langostino
- Población de camarones

A woman wearing a wide-brimmed hat, a blue jacket, and a pink skirt stands next to a white alpaca. The background is a blurred outdoor setting.

Proyecto Genoma Alpaca
Generación y Localización de Marcadores Genéticos
Asociados a Calidad de Fibra e Inmunidad para el
Mejoramiento de Alpacas usando Bancos Genómicos y
de Expresión
INCAGRO

Institución Responsable: Centro de Genética y Biología Molecular, Facultad de Medicina, U. San Martín de Porres

Instituciones Colaboradoras:

- **Sociedad Peruana de Criadores de Alpacas y Llamas (SPAR)**
- **Centre National de Sequençage de France (Genoscope)**
- **Equine and Bovine Genome Center, Animal Sciences, Texas A&M University, USA.**

Problema Central

- Escasez de parámetros racionales para el mejoramiento de la alpaca peruana (cerca 4 millones, 90% del pool mundial).
- 80% especímenes mala calidad textil
- Comerciantes intermediarios favorecían cantidad a calidad de fibra => Mayoría alpacas peruanas híbridas? (llama?), grandes; pero de mala calidad de fibra (gruesa).
- Se necesita recuperar genes de calidad.

Sequence 4044 BP; 680 A; 1239 C; 1417 G; 708 T; 0 other;

Datos del genoma de camélidos

- Mamíferos:
 - $\approx 25,000$ genes
 - 3,300 millones de bases
 - 1 millón de marcadores en todas las regiones cromosómicas (post-it moleculares)
- Camélidos
 - 74 cromosomas
 - < 100 marcadores identificados (anónimos, no relacionado a ningún gen ni a ningún cromosoma). **Necesita $>1,000$**
 - Pocos genes conocidos, **ninguno relevante a mejoramiento**
 - No tiene mapa genético (genes ni marcadores localizados en cromosomas).
 - No hay ningún banco genómico de camélidos. Facilitaría identificación, análisis y aislamiento de genes y marcadores



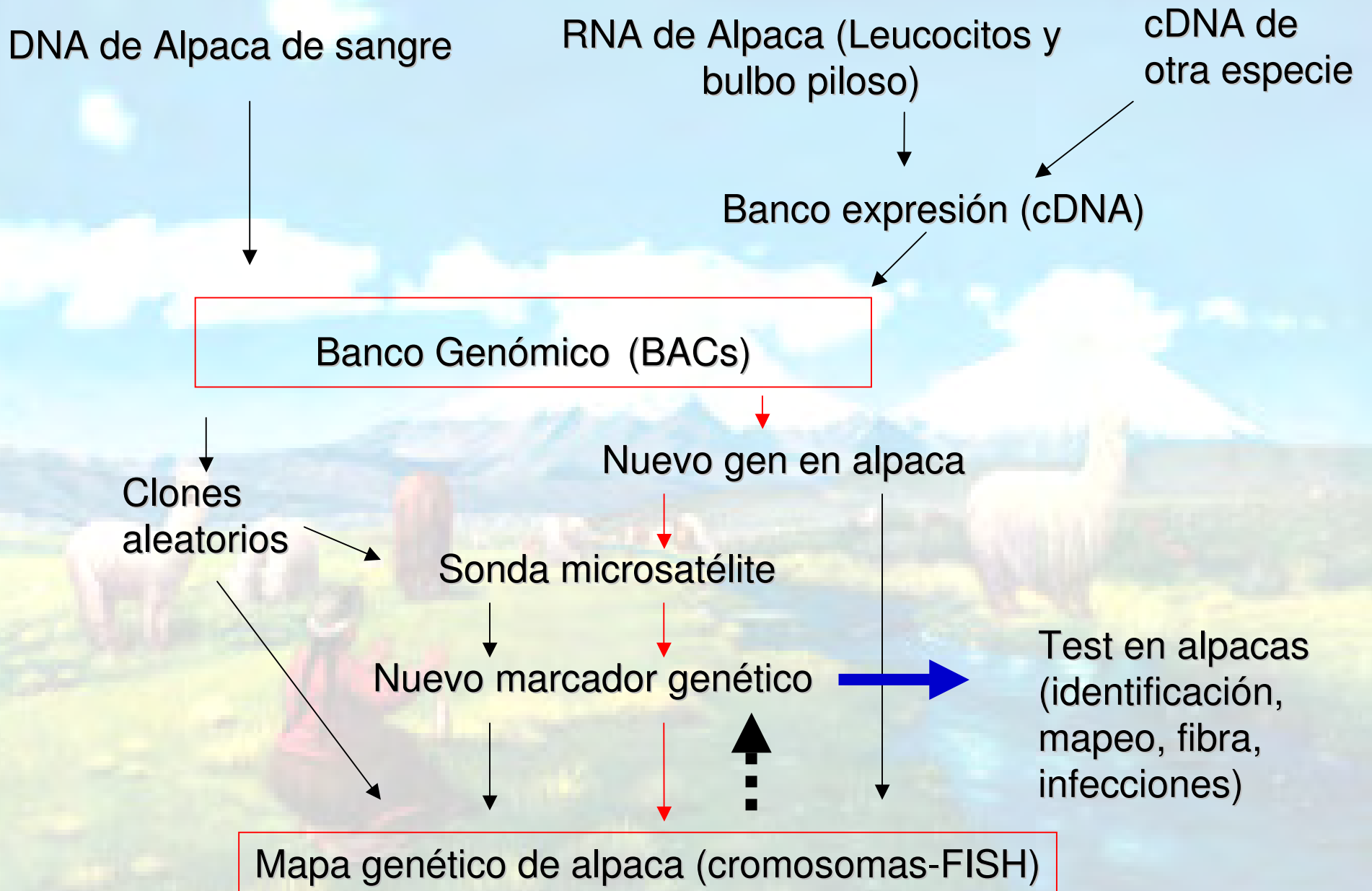
Hipótesis

- En camélidos miles de genes y marcadores genéticos esperando ser revelados
- Origen común de mamíferos reflejado en secuencia de genes, mientras mas cercano, mas coincidencias (ejm. entre artiodactilos). Herramienta de búsqueda.
- Secuencias expresadas menos del 1.5 % del genoma, mayor parte de marcadores en 98.5% restante.
- Secuencias de genomas revela que individuos no son idénticos, variaciones prácticamente en todos los genes.
- Los microsatélites se encuentran cada 10,000-40,000 bases, son muy variables (polimórficas, hasta 90% de informatividad). Muy usados en estudios genéticos

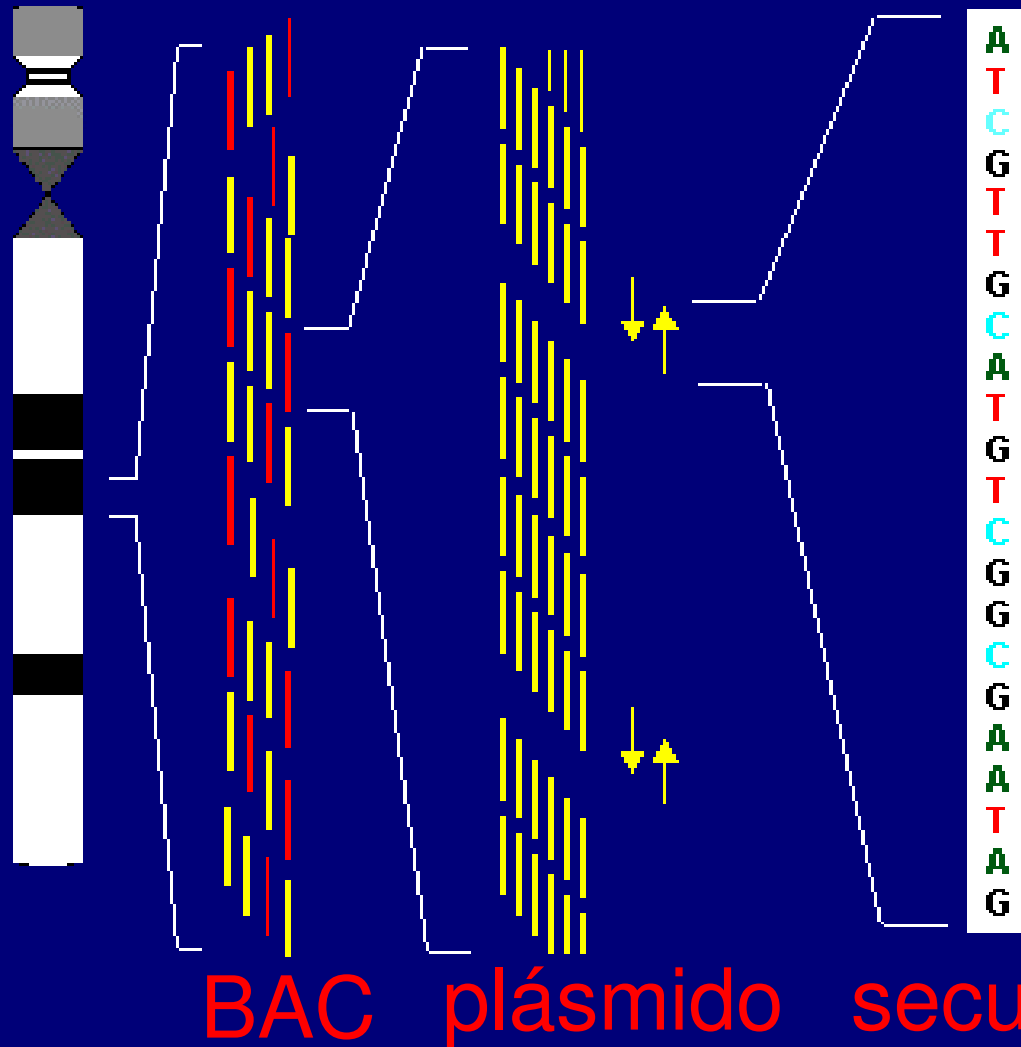
En el estudio se propone...

- Primer banco de genoma BACs de camélidos (sudamericanos, africanos o asiáticos) del mundo.
- Generación de marcadores genéticos en camélidos. Hasta ahora menos de 100 (último año 2003); necesarios más de 500-1000.
- Identificación de genes y marcadores asociados a fibra e infecciones (candidatos para mejoramiento). No existen aún
- Primer mapa genético y cromosómico de alpacas (y camélidos). No existe
- Estudio multinacional de genómica de una especie bandera liderado desde Perú

Diagrama del proyecto



Clonación de cromosoma en diferentes clones a diferentes escalas refinadas



33,000 clones BAC por
juego haploide (entre 5-
7X) para cubrir 95-
98% genoma

Separatas

páginas

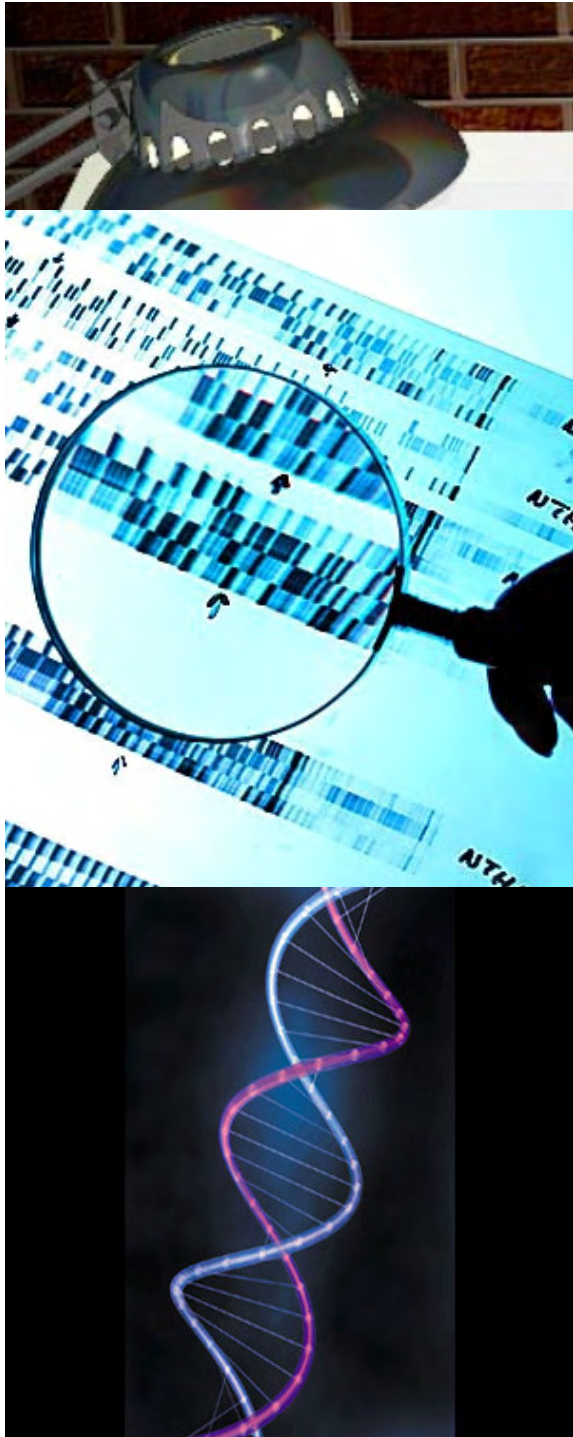
párrafos



Robots para arreglos 96 y 384 pocillos
(Genoscope, Francia)

Robots peruanos...



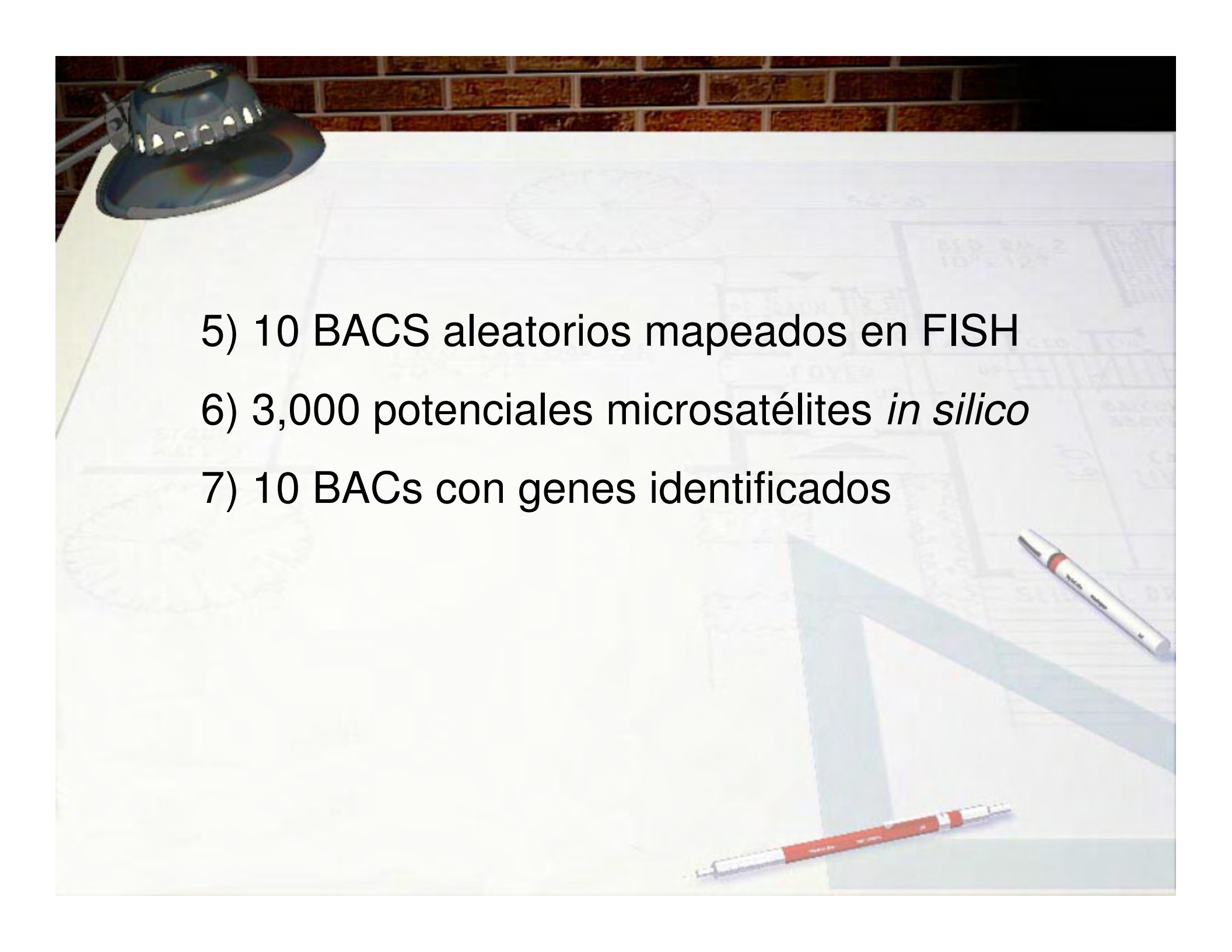


Datamining microsatellite . Work Draft Sequence
Lama pacos

TGTCACCCGATTCATACATGCAAACAAACGTCATG
CTGCTTAGTTAGTTATGCTTTTGTATTATATTCTGAG
ACTCAGGAAACAGGACATACACACACAATTTAAACT
AAAGTGCTTATTTTTAGATAAAAGTGTGCTAAAGGA
AAGAAAATGATTCAAAGACTAGATTAGATGTCATT
TTTCCTGCTAGGAATTTTTTGGTCTCCCCTCAAAC
ACTACATGAAATTTTAAAATGATTTTTTAGAGTGACA
AGTGTTGTTTCAGCTTAGGTACCTGTATACTGTTTC
TGTGATAATTT**TATATATATATATATATATATATA**
TATATATATATATATATATATATTTTTTTTTTTTTAA
ATGGAGGTACTGGGGATTGAACCCAGGGCCTCAT
GCATGCTAAACACATGCTCTACCACTGAGCCGTAC
CTTACCCACCTGTTTCTGTCATGATTGTGACAGCAG
CTAACTACTTCATGGGCTAGGTATTTTCTATGCATT
ATTCAATTTTCACAACCACCCCATGAGCAGAATTAA
TACTATTTTCATTTGACATGAGGAAAACAGGCTTAG
AGAGGTTATTAATTTGTTACTAACT**CGT**CTAAGGGT
AACAGCCAGAGACAGAGAGTGCAGCT

RESULTADOS

- 1** Promedio de 150Kb por clon:
 $3,300'000,000/150,000 = 22,000$
clones/equivalente genómico (1 X).
- 2** 153,600 clones (arreglados en placas de microtitulación formato de 384), 6.9X genomas. Fin 2009: 248,600 clones (11.3 X)
- 3** El DNA de 28,000 clones han sido puestos en membranas de nylon para su selección con sondas específicas.
- 4** 4 membranas de selección están siendo tamizadas para secuencias relevantes a fibra e inmunidad.

- 
- A photograph of a desk with a lamp, a ruler, and a pen, with a list of tasks overlaid on a blueprint background. The desk is covered with a white sheet of paper that has faint blueprints or technical drawings on it. A desk lamp is visible in the top left corner, and a red pen and a ruler are in the bottom right corner. The background is a brick wall.
- 5) 10 BACS aleatorios mapeados en FISH
 - 6) 3,000 potenciales microsátélites *in silico*
 - 7) 10 BACs con genes identificados



Generación de Marcadores Genéticos Para Evaluar la Biodiversidad de Recursos Marinos

- Centro de Genética y Biología Molecular - Facultad de Medicina-U San Martín de Porres
- Laboratorio de Artes de Pesca- Fac. Biología - U Nacional de San Marcos
- Instituto del Mar del Perú
- University of South Caroline
- Universidad Federal de Minas Gerais
- Universidad Autónoma de México

FINCYT-BID

- Propuesta 115 Proyecto de Interés Nacional 2008



METAS

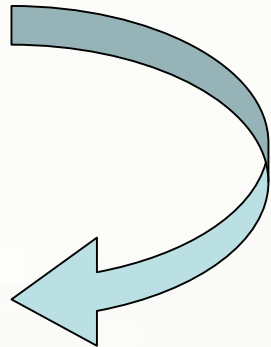
- Dar al Instituto del Mar criterio racional (información) para decisiones de manejo pesquero (permisos/vedas)
- Contribuir con el desarrollo de una plataforma tecnológica local para el estudio de la biodiversidad

FUNDAMENTOS

Marcadores fenotípicos



Caracteres morfológicos
Caracteres merísticos
Caracteres bioquímicos

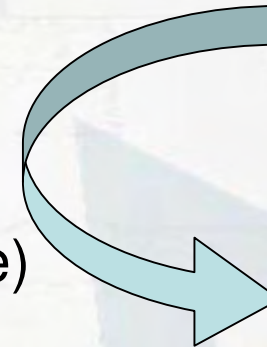


Presentan variación

Marcadores genotípicos



Caracteres genéticos



No varía



Genoma nuclear
Genoma mitocondrial

En el
Individuo
(cigoto → muerte)





Objetivos Específicos

- Objetivo específico 1: **Generar marcadores genéticos** en "anchoveta peruana" (*Engraulis ringens*), "merluza peruana" (*Merluccius gayi peruanus*), "concha de abanico" (*Argopecten purpuratus*) y "pota" (*Dosidicus gigas*)
- Objetivo específico 2: **Evaluar la diversidad genética** de las poblaciones con los indicadores moleculares de DNA
- Objetivo específico 3: Identificar delimitando geográficamente y temporalmente las unidades poblacionales de las especies estudiadas y determinar la existencia de un **pool genético único o de varios stocks.**



Objetivos Específicos (cont.)

- Objetivo específico 4: Identificar los indicadores genéticos adecuados para la **autenticación** molecular de los productos hidrobiológicos procesados para determinar su origen biológico.
- Objetivo específico 5: **Fortalecer capacidades locales** por formación de recursos humanos y equipamiento, así como la réplica y transferencia a otras entidades nacionales interesadas en la evaluación de la biodiversidad.

Productos Ofrecidos en las Distintas Etapas del Proyecto

V Componente

04 tesis
08 informes
01 Taller
01 Portal
12 artículos
6 congresos
Equipos

30 marcadores genéticos en el total de especies a estudiarse

I Componente

04 indicadores / especie de diversidad genética

04 determinaciones de estructura poblacional (genético – pesquero).

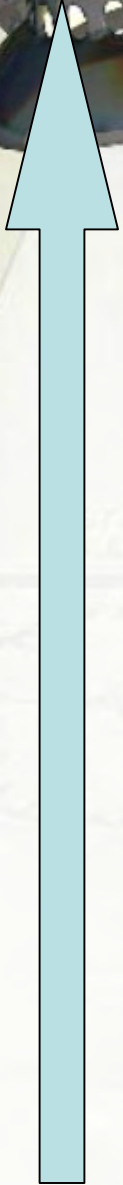
II Componente

01 Kit para la autenticación de especies

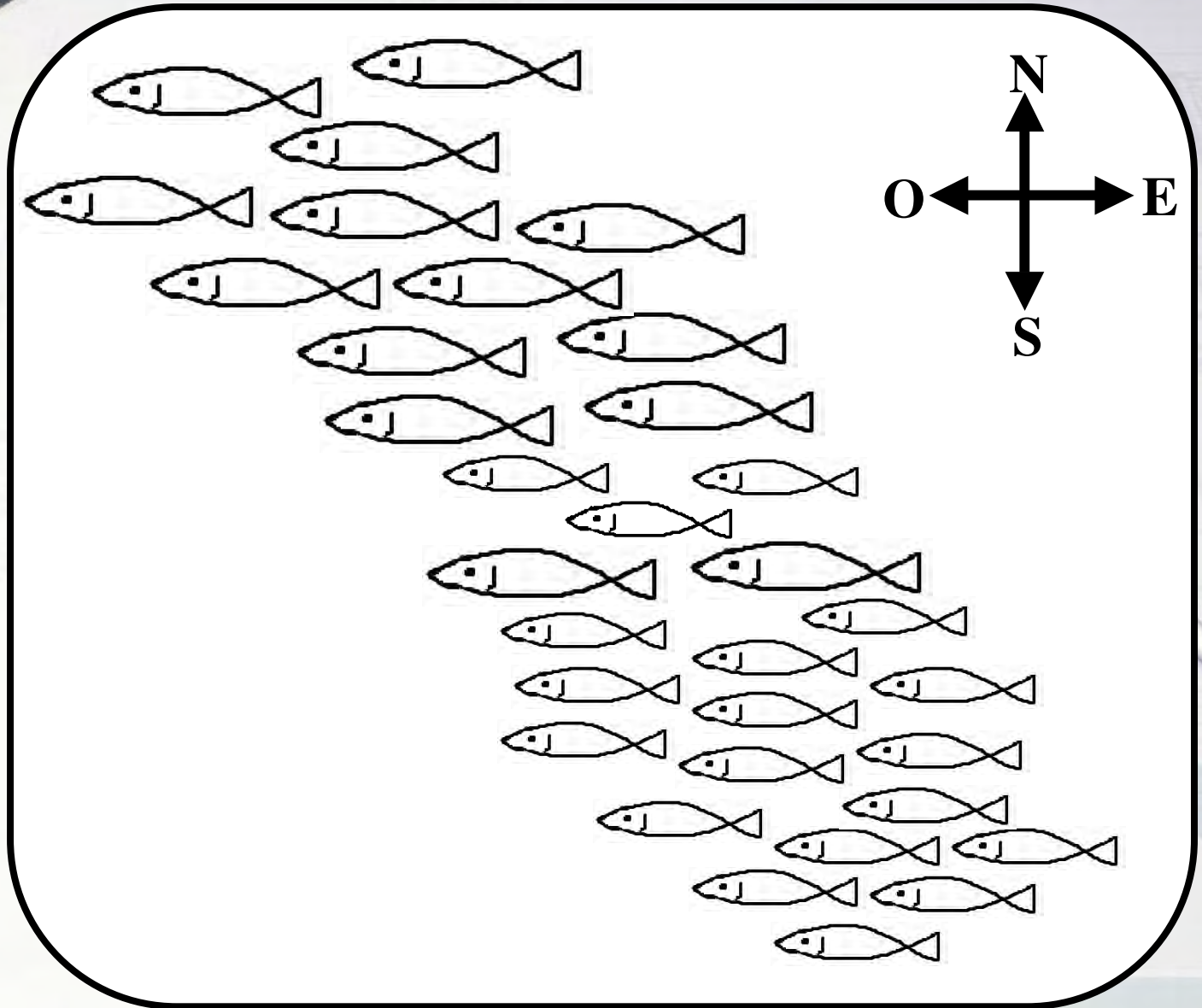
III Componente

IV Componente

Latitud 3° Una población: Estratificación latitudinal por tallas.

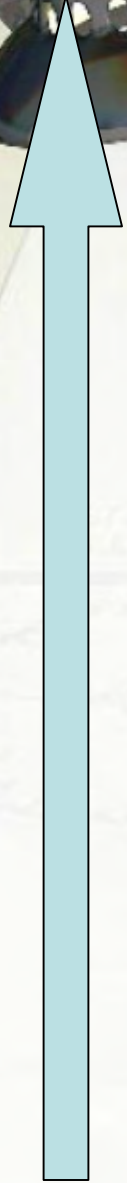
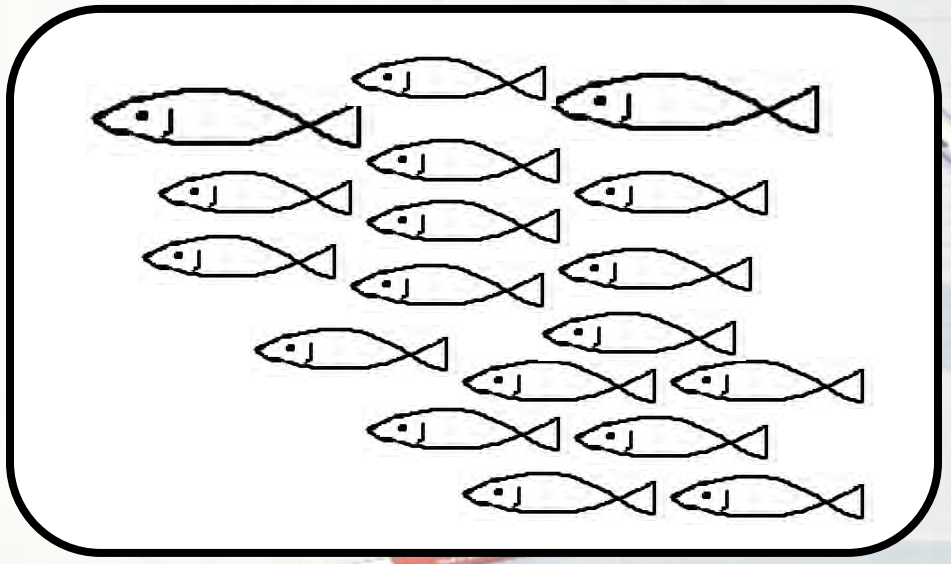
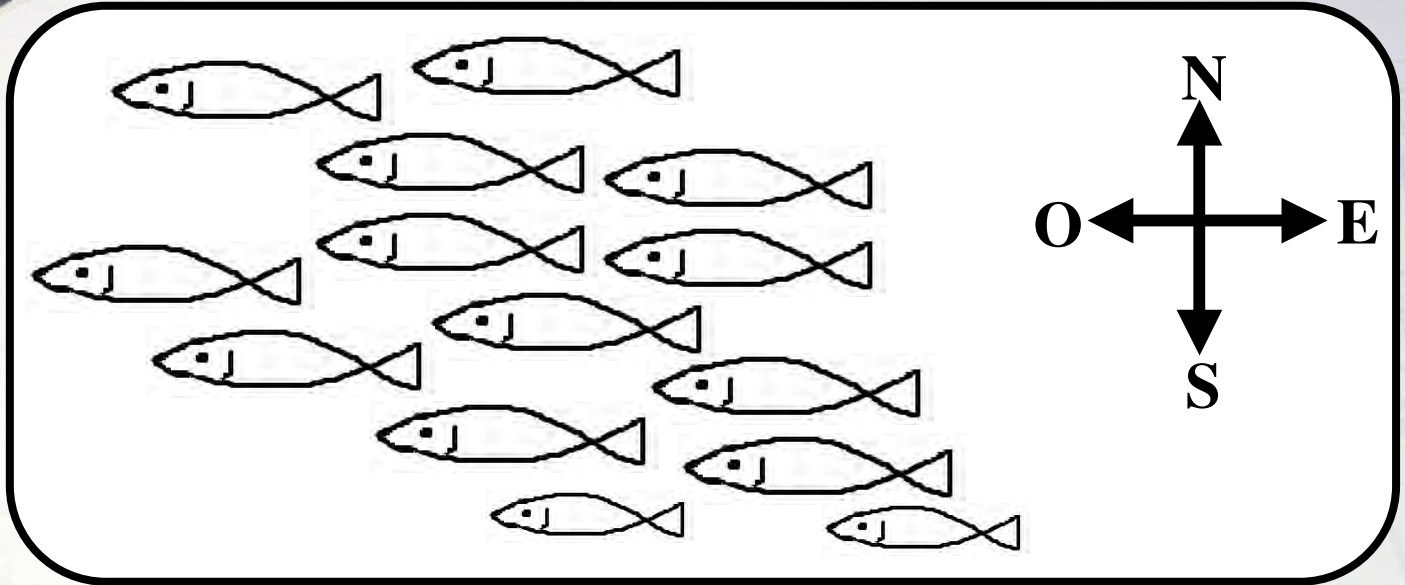


Latitud 7°



Latitud 3°

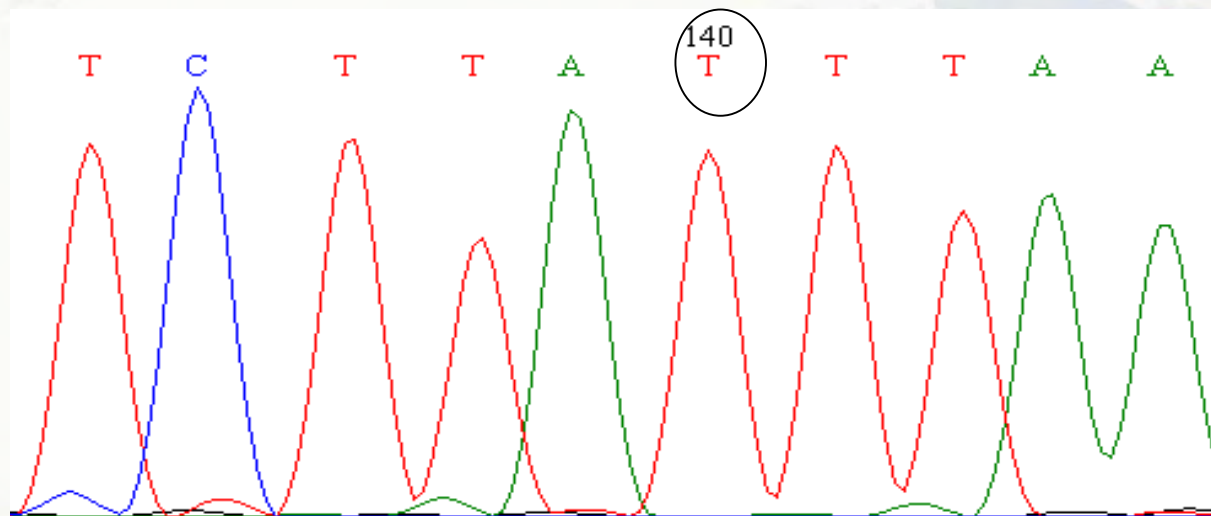
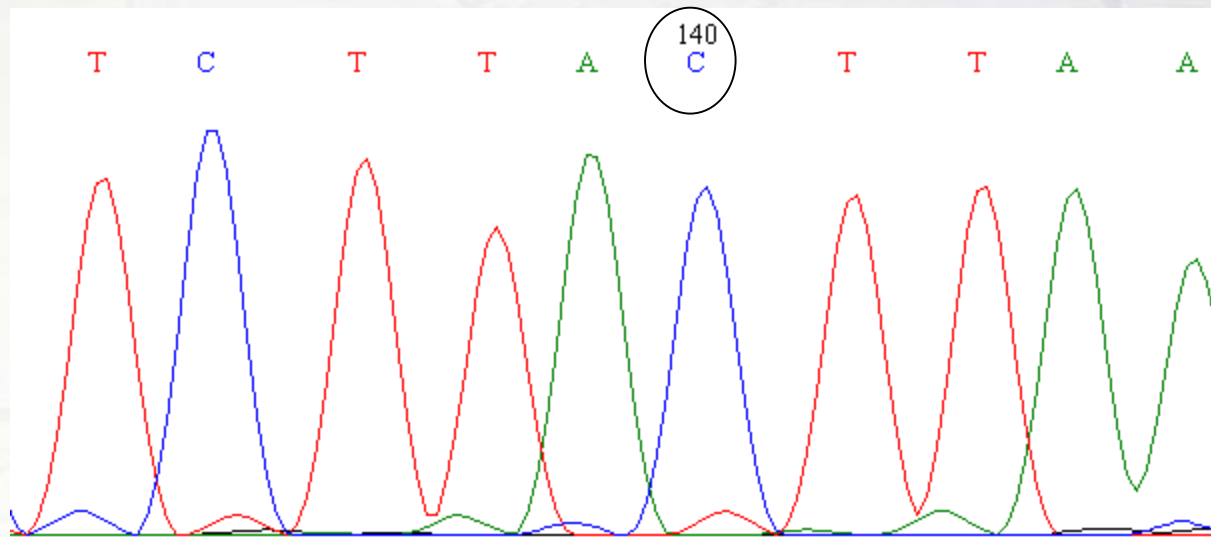
Dos poblaciones: Diferencias en la estrategia reproductiva

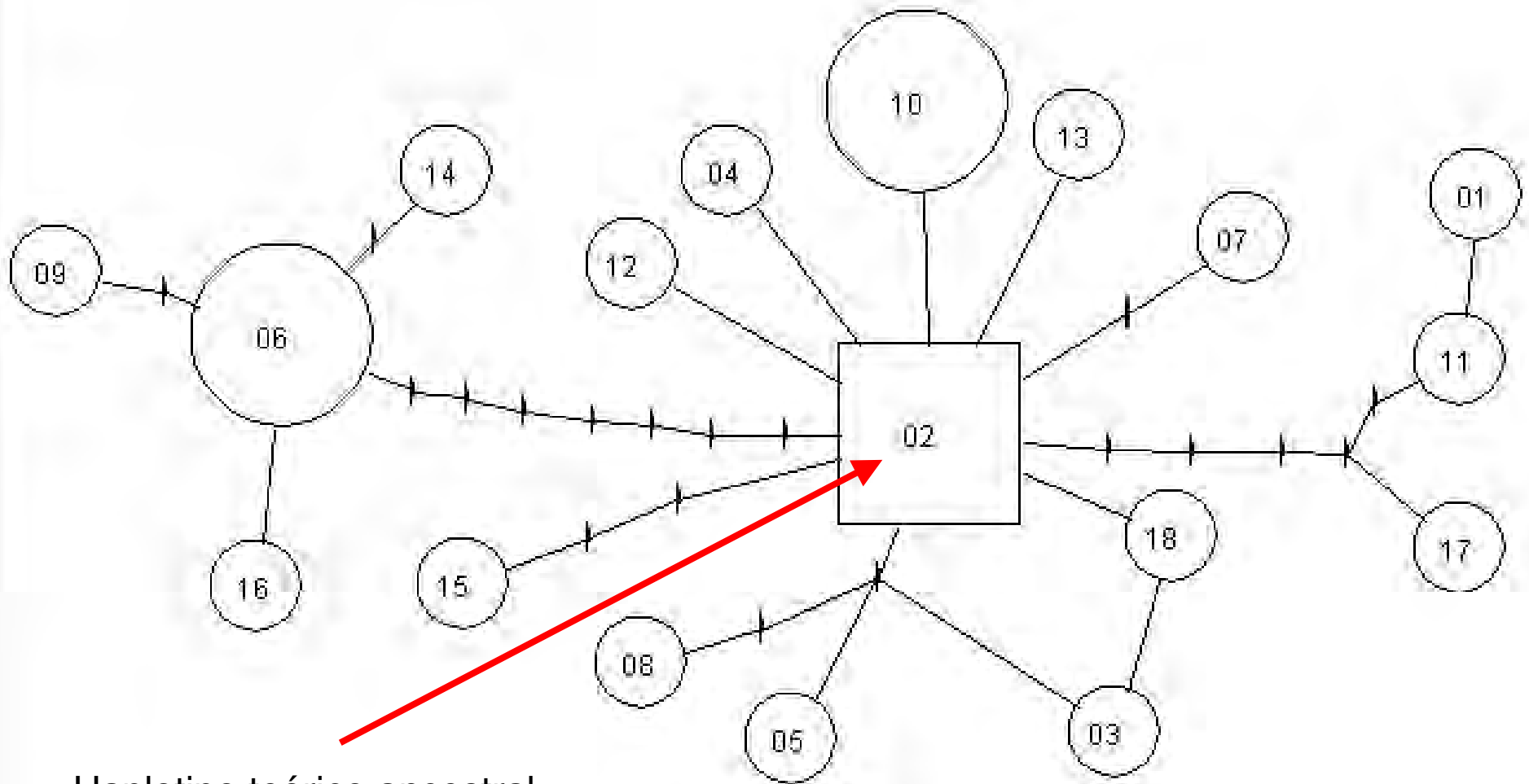


Latitud 7°



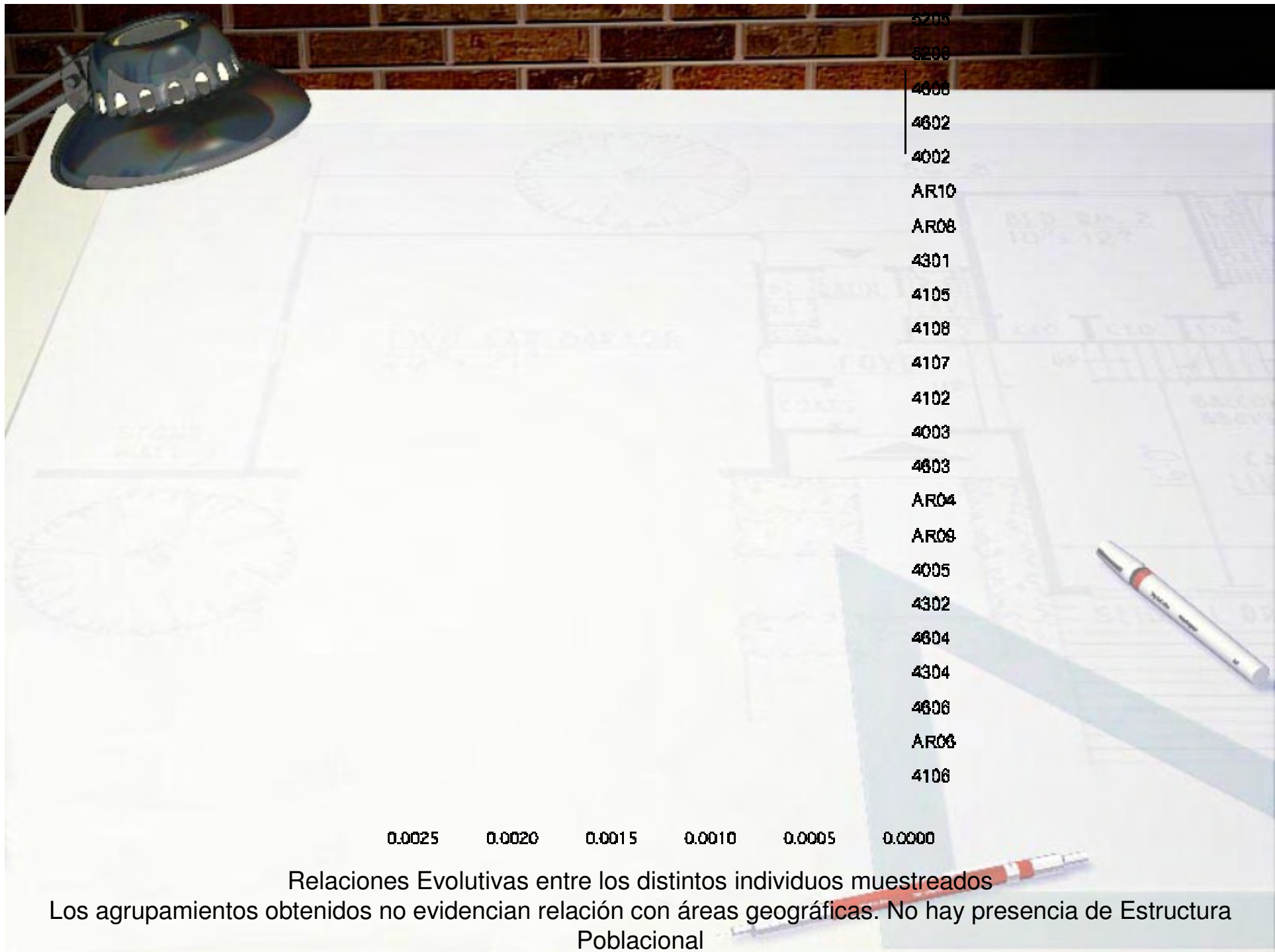
Ejemplo de un SNP mtDNAHV1 : C131T





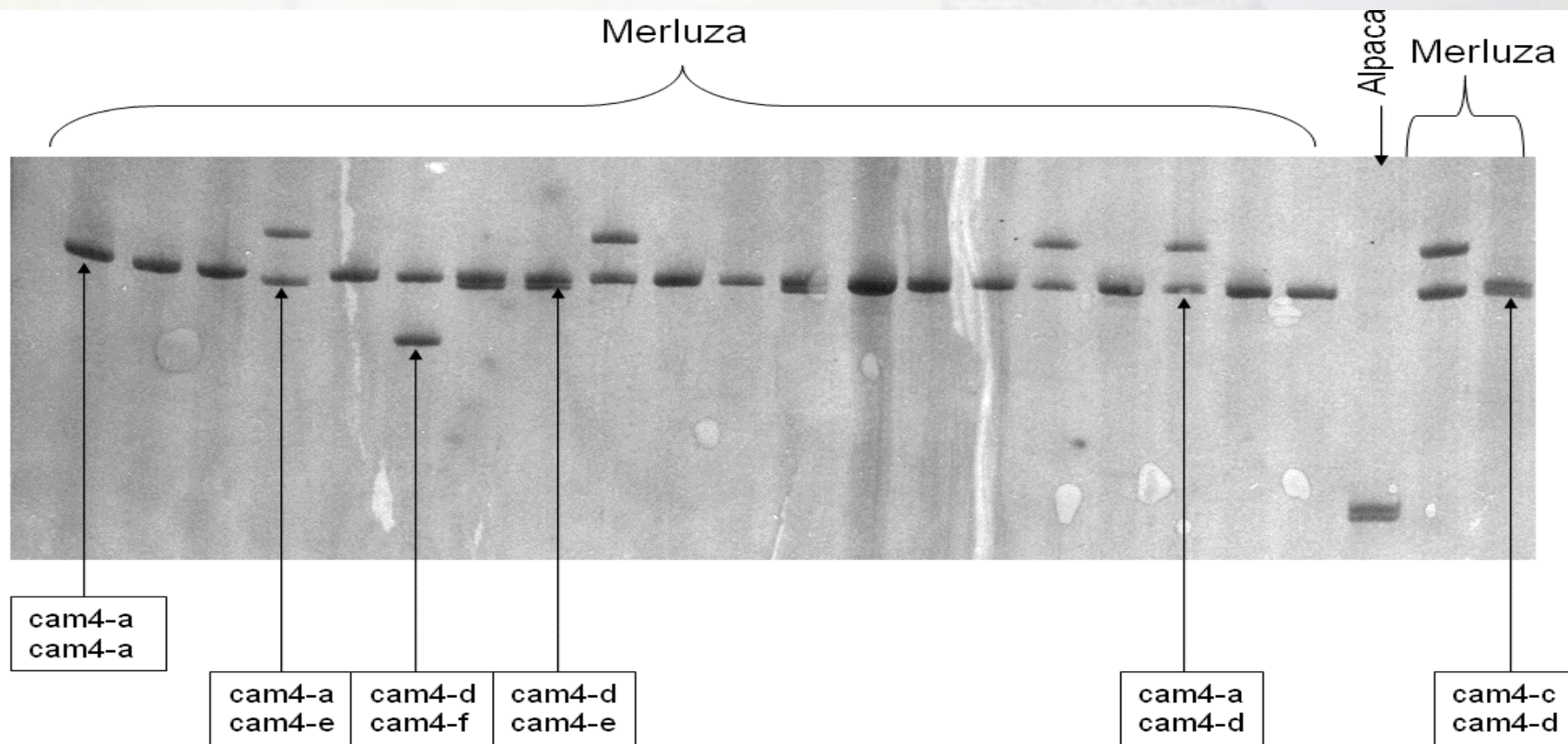
Haplotipo teórico ancestral

Minimum spanning network de los haplotipos detectados en *Merluccius gayi* peruanus. (TCS Software).%



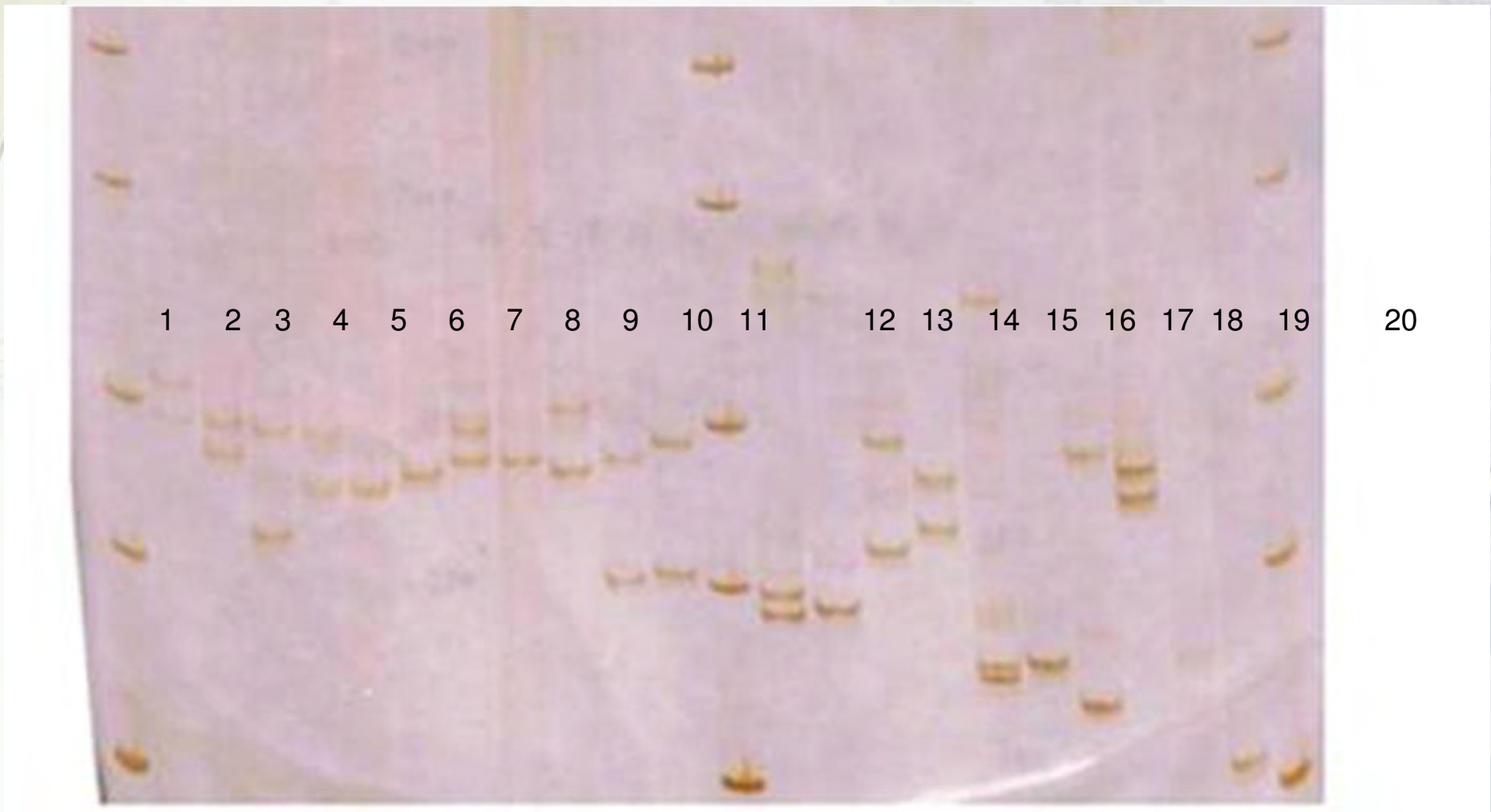
Adaptación de marcadores de un género a otro

Marcadores usados para *Xiphias gladius* (pez espada, fam. Xiphiidae) y usados en *Merluccius gayi peruanus* (merluza peruana, fam. merlúcido)



Al menos 5 alelos

Uso de marcadores de Anchoqueta japonesa en Anchoqueta peruana





Conclusiones

- Genética y Genómica principales actividades en Perú
- Mejoramiento alpacas
- Poblaciones peces
- Poco “Ingeniería Genética”
- Gran potencial para mejora de ganado adaptado a condiciones locales.