

CHEQUEO DE PARENTESCO EN UNA FAMILIA CUBANA DE BOVINOS

Odalys Uffo*, Arianne Sanz*, Siomara Martínez*, Inmaculada Martín-Burriel**,
Pilar Zaragoza** y Rosario Osta**

*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: uffo@censa.edu.cu; **Lab. Genética, Bioquímica y Grupos Sanguíneos,
Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Zaragoza, España

RESUMEN: Se realizó la amplificación por PCR de 15 loci microsatélites de los 30 recomendados por ISAG para estudios de biodiversidad, en 20 animales pertenecientes a la familia de un animal de alto valor productivo. Se simplificó el análisis en un trío (madre-padre-hijo) para comprobar la presencia de alelos procedentes de la madre y del padre en el hijo (chequeo de parentesco), y se determinaron las frecuencias alélicas para cada uno de los loci estudiados. Este es el primer reporte de control y/o chequeo de paternidad en bovinos que se realiza en el país por medio de la utilización de marcadores moleculares, específicamente, de microsatélites.

(Palabras clave: paternidad; microsatélites; bovino)

PATERNITY TEST IN A CUBAN BOVINE FAMILY

ABSTRACT: An amplification by PCR of 15 microsatellite loci of the 30 recommended by ISAG to be used in biodiversity studies was carried out in 20 animals belonging to the family of a high productive value cow. The analysis was simplified in a trio (dam-sire-rearing) to probe the presence of alleles from the dam and the sire on the rearing (paternity test); and the allelic frequencies for each studied loci were calculated. This is the first report of paternity test and/or control in Cuba using molecular markers, specifically from microsatellites.

(Key words: paternity; microsatellites; bovine)

INTRODUCCIÓN

En especies de interés económico, la identificación genética y el obligado establecimiento de pruebas de paternidad quedan lejos de cualquier duda como argumento para la fiabilidad y credibilidad de los libros genealógicos en diferentes razas. Todo aquel que se dedique, directa o indirectamente, a la cría animal y la selección, debe aceptar el análisis de conformidad de la relación filial de sus animales.

La cría de animales nos plantea preguntas acerca de la identidad biológica de estos, cuya resolución es posible mediante análisis genéticos. Una correcta identificación y el chequeo de parentesco permitirán una elección correcta de aquellos animales que van a ser apareados, pudiendo disminuir considerablemente la

consanguinidad (4). Principalmente en vacunos, cerdos y caballos, el control de parentesco se ha realizado de forma rutinaria en la mayoría de los países mediante la metodología de grupos sanguíneos, estandarizada a nivel internacional por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG).

Para este tipo de estudios, los marcadores empleados por diferentes laboratorios y recomendados por la ISAG, deben cumplir una serie de requisitos, entre los que se encuentran: deben ser de dominio público con herencia mendeliana conocida (es decir, con presencia visible en el hijo de un alelo de origen materno y otro de origen paterno), no existir ligamiento con otros marcadores utilizados en la prueba, poseer una elevada variabilidad entre individuos (incluso de la misma raza), no existir ninguna influencia ambiental (que per-

mita realizar el análisis en cualquier momento), no suponer riesgo para el animal y deben implicar análisis de laboratorio sencillos, rápidos y de resultados repetibles (6) .

Los avances en genética molecular y biotecnología, así como el mayor conocimiento del genoma de las diferentes especies, están permitiendo la puesta a punto de nuevos métodos de identificación genética que permiten cumplir este tipo de características. A partir del descubrimiento de loci, basados en pequeñas repeticiones, altamente variables a lo largo del genoma (MICROSATELITES)(3), y del desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para su detección, se minimiza la mayoría de los problemas que presentaban técnicas anteriormente utilizadas como DNA Fingerprinting (Huella dactilar del DNA)(2) y VNTR (Minisatélites) (5). Los microsatélites consisten en secuencias cortas (de 1 a 4 nucleótidos), repetidas de 10 a 50 veces a lo largo del genoma de una especie. La variación que presentan los diferentes individuos de una misma especie se basa en el número de veces que se repite la secuencia motivo, por lo que un modelo de herencia, en la mayoría de los casos, es de tipo mendeliana.

En el CENSA, se cuenta con un banco de ADN procedente de animales emparentados con un animal de alto valor productivo. Estas muestras han sido analizadas previamente para determinar los genotipos de las proteínas de la leche (7). En esta ocasión, se consideró como un grupo de animales adecuado para la verificación o el control de filiación en dicha familia, lo que permitirá comenzar la optimización de las Pruebas de Paternidad en Bovinos.

El objetivo de este trabajo es comprobar la relación de parentesco existente entre 20 animales procedentes de una familia vacuna, en la que está involucrada un animal de alto valor productivo, por medio de la tipificación de 15 microsatélites de los 30 recomendados por la ISAG para los estudios de biodiversidad debido a su localización en distintos cromosomas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio, 20 animales emparentados con un animal de alto valor productivo, cuyo material genético forma parte del banco de ADN del CENSA. La Figura 1 muestra la presunta relación que existe entre los mismos; lamentablemente, no contamos con el ADN de algunos de los sementales padres de varios de estos individuos.

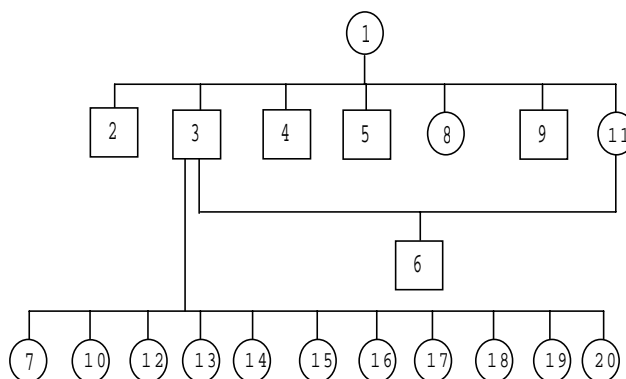


FIGURA 1. Árbol filogenético de la familia estudiada./ *Phylogenetic tree of the studied family*

Se procedió a la amplificación por PCR de 15 microsatélites, de los 30 recomendados por ISAG para estudios de paternidad.

En la Tabla 1 aparecen los loci microsatélites estudiados (http://www.fao.org/dad_is). La PCR radiactiva se realizó en un volumen final de 10µL, conteniendo buffer de la polimerasa (1x), dNTPs (2mM), 20pmol de cada cebadores y se adicionó el radioisótopo en forma de compuesto marcado (α -[32 P]-dCTP), directamente en la mezcla de amplificación; se utilizaron, como molde, 50ng/µL de ADN y se adicionó 1U de TaqPol por reacción. Se utilizaron programas comunes de amplificación por PCR, solo variando la temperatura de alineamiento (Ta) en función de las Tm de los cebadores.

La visualización de las reacciones de amplificación se realizó tras electroforesis en geles desnaturizantes de poliácridamida 6%. Se aplicaron 3µL del producto de PCR, previa desnaturización a 96°C por 5 minutos. A dichos geles se les aplicó un campo eléctrico, con una potencia de 65Watts. La corrida se realizó en una cámara de electroforesis vertical para geles de secuencia y en buffer TBE1^x. La observación de los resultados se realizó por autorradiografía de los geles a placas Kodak de rayos X.

Para la determinación de los genotipos, se realizó la comparación de los perfiles electroforéticos obtenidos con muestras patrones de genotipo conocido para cada locus.

Por medio de la utilización del software Biosys, se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de los marcadores en estudio.

TABLA 1. Loci microsatélites empleados en el estudio./ *Studied microsatellite loci*

Loci	Nombre	Loci	Nombre	Loci	Nombre
ILSTS005	MS1	HEL1	MS6	BM2113	M15
INRA5	MS2	HEL5	MS8	INRA23	M16
INRA63	MS3	TGLA227	M11	ETH152	M18
ETH225	MS4	TGLA122	M13	INRA32	M20
ETH10	MS5	BM1824	M14	HEL9	M21

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la Figura 1, la mayoría de los animales incluidos en el estudio son hijos de un semental hijo de la progenitora de la familia, en la cual hay un alto nivel de consanguinidad, debido a que este semental fue utilizado para reproducir el genofondo familiar, incluso, se realizaron varios cruzamientos entre hermanos, lo cual dio como resultado la existencia de muy poca variabilidad en los alelos

encontrados para los loci estudiados en esta familia. En la Tabla 2, aparecen los genotipos de los microsatélites de cada uno de los individuos, y en la Tabla 3, se muestran las frecuencias alélicas para los mismos.

Con la finalidad de mostrar de forma simplificada la verificación de parentesco, utilizaremos solamente un trío (Madre-Hijo-Padre, animales 11-6-3) como ejemplo; en la Tabla 2a se observa que el hijo, efecti-

TABLA 2. Genotipos de los loci analizados para cada muestra./ *Genotypes of the analyzed loci for each sample*

	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS8	M11	M13	M14	M15	M16	M18	M20	M21
1	BC	AC	FF	FI	BB	BE	CF	HI	DF	CF	GI	EH	AG	DD	GH
2	BC	CC	EE	FI	BF	EE	CF	IK	DE	CF	II	FH	CG	DD	GH
3	CC	AC	EF	EI	BF	DE	FF	FI	EF	CF	GG	FH	AG	DD	GH
4	BC	AB	EE	KF	BB	BD	CJ	HI	DJ	CC	GI	FH	AD	DD	FH
5	BC	AA	EF	EF	BF	BF	CF	FI	EF	CC	GG	FH	CG	DD	GH
6	BC	CC	EF	EI	BF	DB	FF	GI	EE	CF	GI	FH	AA	DD	HH
7	BC	AC	DE	KI	BB	HA	FF	GI	RF	CF	GI	CF	AA	BC	GH
8	BC	AC	FF	KF	BB	BF	FF	DI	DE	CC	GH	DH	AG	DE	FH
9	CC	AC	EF	FI	BF	BF	FF	HK	EF	BC	GI	EF	CG	DD	GH
10	CE	AB	EF	FI	BF	AC	CF	GK	EF	CC	BJ	GI	AB	DE	HH
11	BC	AC	DF	FI	BH	AB	FF	GI	DE	EF	HI	EG	AG	DE	GH
12	BC	AC	DF	KI	BF	CD	CF	FH	FJ	CC	CG	FI	DG	DG	GG
13	CC	AA	FI	FI	BF	AD	FF	FI	BF	CC	CG	FI	AD	DE	GH
14	BC	CC	EF	GI	BB	DD	FF	IK	DF	CF	GI	FG	AD	DE	GH
15	CC	AA	EF	KE	FG	DE	CF	CF	DD	AC	GH	FI	GG	DF	AG
16	BC	BC	EE	FI	BF	AD	FF	GI	EI	FF	GI	FI	AE	DF	AG
17	BC	BC	EF	EF	BF	AD	FF	FH	EF	CE	CG	HI	CG	DE	AG
18	BC	BB	EF	KI	FH	AE	CF	IJ	FE	CE	GI	GH	GG	DF	FG
19	BB	AA	EE	FI	FG	DD	FF	GI	EE	AF	GI	DH	AF	DF	FG
20	CC	AB	FF	EF	FG	CE	JF	CI	EJ	BC	BG	BF	GG	DE	DG

TABLA 2a. Genotipos de los loci analizados para el trío ejemplo./ *Genotypes of the analyzed loci for the example trio*

	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS8	M11	M13	M14	M15	M16	M18	M20	M21
3	CC	AC	EF	EI	BF	DE	FF	FI	EF	CF	GG	FH	AG	DD	FH
6	BC	CC	EF	EI	BF	DB	FF	GI	EE	CF	GI	FH	AA	DD	HH
11	BC	AC	DE	FI	BH	AB	FF	GI	DE	EF	HI	FG	AG	DE	GH

TABLA 3. Frecuencias alélicas para cada uno de los marcadores analizados./ *Allelic frequencies for each analyzed marker*

	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS8	M11	M13	M14	M15	M16	M18	M20	M21
A	0.00	0.421	0.00	0.00	0.00	0.175	0.00	0.00	0.00	0.059	0.00	0.00	0.316	0.00	0.079
B	0.375	0.184	0.00	0.00	0.500	0.075	0.00	0.00	0.079	0.059	0.050	0.026	0.00	0.028	0.00
C	0.600	0.395	0.00	0.00	0.00	0.175	0.200	0.050	0.00	0.529	0.075	0.026	0.184	0.028	0.00
D	0.00	0.00	0.079	0.00	0.00	0.275	0.00	0.025	0.158	0.00	0.00	0.026	0.105	0.667	0.026
E	0.025	0.00	0.447	0.125	0.00	0.175	0.00	0.025	0.342	0.088	0.00	0.132	0.026	0.194	0.000
F	0.00	0.00	0.447	0.325	0.350	0.100	0.750	0.150	0.263	0.265	0.00	0.263	0.053	0.056	0.132
G	0.00	0.00	0.00	0.050	0.075	0.000	0.00	0.150	0.00	0.00	0.475	0.132	0.316	0.028	0.395
H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.075	0.025	0.00	0.100	0.00	0.00	0.075	0.211	0.00	0.00	0.368
I	0.00	0.00	0.026	0.350	0.00	0.00	0.00	0.350	0.026	0.00	0.300	0.184	0.00	0.00	0.00
J	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.050	0.079	0.00	0.025	0.00	0.00	0.00	0.00
K	0.00	0.00	0.00	0.150	0.00	0.00	0.00	0.100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
R	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.026	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

vamente, porta un alelo procedente de la madre y otro del padre, para todos los microsatélites tipificados, evidenciando el patrón de herencia mendeliana en la familia.

Moore *et al.*, (6) describieron una posible conservación de microsatélites dinucleótidos entre especies muy relacionadas, incluso se han encontrado polimorfismos previamente reportados para microsatélites del ganado bovino, en especies tan lejanas como *Cervus elaphus*. Mommens *et al.* (5) utilizaron un grupo de 33 pares de primers probados en bovinos para resolver casos de paternidad de bisontes, y encontraron que, a pesar de que observaron algunos alelos específicos para esta especie en 12 de los 33 marcadores, la mayoría de los alelos encontrados tuvieron idéntica movilidad y talla que los encontrados en algunas razas bovinas. Con relación a nuestros resultados, en 5 de los 15 loci estudiados, aparecen alelos que se corresponden con algunos de los reportados por Mommens *et al.* (5). Además, en 3 de estos loci testados en ganado Criollo de Cuba, aparecieron alelos nuevos no reportados en el ganado europeo y sí en bisón, lo que es una muestra más de la posibilidad de conservación de loci microsatélites entre especies. Estos resultados complementan los estudios para el establecimiento de la metodología en el empleo de microsatélites para pruebas de paternidad en bovinos en Cuba, comenzados por Sanz *et al.* (9), quienes tipificaron 9 loci en otros 20 animales de la misma familia.

El principio utilizado para este análisis de paternidad está basado en el análisis de exclusión, es decir, si el hijo no comparte un alelo con el padre y otro con la madre, no puede ser hijo de esa pareja, asignándose como resultado compatible o no, según sea el caso. Un análisis incompatible tiene una fiabilidad del 100%, sin embargo, la compatibilidad lleva asignada una probabilidad en la seguridad del resultado que depende de una serie de factores, como el número de marcadores analizados y las frecuencias de cada alelo en la población analizada. En nuestro caso, esta seguridad en el resultado está garantizada por la elevada cantidad de loci estudiados, que aunque fueron el 50% de los recomendados por ISAG, abarcan un amplio rango en el genoma bovino y producen número elevado de alelos que nos permite realizar la asignación y chequeo de paternidad en cada caso, a pesar de que en gran parte de la familia, no contamos con el ADN de los dos progenitores. Las referencias consultadas, así como la propia experiencia, indican que al menos 6 ó 7 marcadores, serían necesarios analizar para tener resultados fiables; por lo tanto, podemos considerar que los nuestros lo son, puesto que analizamos 15 de los 30 microsatélites recomendados por la ISAG con los que abarcamos una parte considerable del genoma bovino que incluye regiones de 15 cromosomas diferentes. De esta manera se pudo demostrar que, efectivamente, todos los integrantes de la familia estudiada son miembros de la misma.

Las principales ventajas presentadas por los microsatélites, para su utilización en identificación genética, podrían resumirse: son marcadores estables

y muy variables, son muy numerosos, están distribuidos por todo el genoma, permiten la detección a partir de pequeñas muestras que contengan material genómico, permiten el diagnóstico rápido (por PCR) y la aplicación de los métodos estadísticos para su estudio es sencilla (por ejemplo, permite un porcentaje de exclusión de paternidad superior al 99%) (1).

Con este trabajo, se comienza la utilización de los microsatélites para la determinación de paternidad en ganado bovino cubano.

REFERENCIAS

1. Ferreira, M.A.; Grattapaglia, D. (1995): Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética (2nd ed.) Embrapa.
2. Jeffreys, A.J.; Wilson, U.; Neuman, R.; Keiten, J. (1988): Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucl. Acid Res.* 16:10953-71.
3. Koreth, J.; O'Leary, J. y McGee, O.D. (1996): Microsatellites and PCR genomic analysis. *J. Pathol.* 178: 239-248.
4. Legates, J.E. y Warwick, E.J. (1992): Cría y mejora del ganado. Librería Científica Ltda. Traducción de la 8^{va} edición en inglés de "Breeding and Improvement of Farm Animals. Ed. Mc Graw, Hill Publishing Company.
5. Mommens, G.; Van Zeveren, A.; Peelman, L.J. (1998) Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity cases in American bison, *Bison bison* L. *Anim. Genetics.* 29: 12-18.
6. Moore, S.S.; Sargeant, L.L.; King, T.J.; Mattick, J.S.; Georges, M.; Hetzel, D.J.S. (1991): The conservation of dinucleotide microsatellite among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomic.* 10: 654-60.
7. Nakamura, Y.; Lepper, M. (1987): Variable number of tandem repeats (VNTR) markers for human gene mapping. *Science.* 235:1616-1622.
8. Osta, R. (1999): Curso de genética molecular: Observación y manipulación del genoma en producción y sanidad animal, CENSA.
9. Sanz, A.; Uffo, O.; Miranda, I.; Martínez, S. (2002): Empleo de los microsatélites para determinar paternidad en bovinos cubanos, *Rev. Salud Anim.* 24(3): 166-169.

(Recibido 9-11-2001; Aceptado 6-3-2002)