

Comunicación corta

**EMPLEO DE LOS MICROSATÉLITES EN PRUEBAS DE PATERNIDAD
EN CANINOS**

Arianne Sanz, Odalys Uffo y Siomara Martínez

*Laboratorio de Polimorfismo Genético. Grupo de Biología Molecular. Centro Nacional de Sanidad
Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba
Correo electrónico: uffo@censa.edu.cu*

RESUMEN: Debido al importante papel que cumplen los microsatélites como marcadores en el genoma canino, se trabajó en la estandarización de la PCR de los microsatélites LEI 008, LEI 002, LEI 004, LEI 101, LEI 111 y VIAS-D 10, para ser empleados en pruebas de paternidad en perros.

(Palabras clave: marcadores; microsatélites; PCR; pruebas de paternidad)

APPLICATION OF MICROSATELLITES IN CANINE PATERNITY TESTS

ABSTRACT: Due to microsatellites provide an adequate basis for assigning paternity in pedigree, we worked to standardize the PCR of LEI 008, LEI 002, LEI 004, LEI 101, LEI 111 and VIAS-D 10 microsatellites in order to be used in paternity tests in dogs.

(Key words: markers; microsatellites; PCR, paternity tests)

El control eficiente de los registros de filiación en la crianza de perros es de gran importancia, se incrementa la demanda de sistemas de tipaje más confiables. Gracias al desarrollo de la biotecnología y la identificación de secuencias repetitivas en los genomas mamíferos, han surgido nuevos métodos de identificación genética.

En la actualidad se conocen dos clases principales de secuencias repetitivas: los minisatélites (2) y los microsatélites (4). Los microsatélites consisten en secuencias cortas de 1 a 4 nucleótidos repetidos entre 10 y 50 veces a lo largo de todos los genomas mamíferos, y constituyen una herramienta adecuada para los análisis de paternidad en caninos (6), con un grado de confiabilidad del 95-99% (3).

El propósito de este trabajo fue ajustar las condiciones de trabajo con 6 microsatélites caninos, para emplearlos como método de registro de filiación.

La extracción del material genético se realizó a partir de 1mL de sangre al seguir el método descrito por Jean Pierre (1). La amplificación por PCR de los microsatélites LEI 008, LEI 002, LEI 004, LEI 101, LEI 111 y VIAS-D 10 se realizó mediante el procedimiento general sugerido por Zajk y col. 1997, con algunas modificaciones. Las reacciones de amplificación procedieron en 25mL, se probaron concentraciones de MgCl₂ desde 0.5mM hasta 3mM, y se obtuvieron buenos resultados a partir de 1.5mM, por tanto se llevó a cabo la reacción a 1.5mM. con la que se logró visualizar mejor los alelos. Además, la mezcla contenía 0.8mM de cada cebador, 100mM de cada dNTP, 1u de Taq Polimerasa y 100ng de ADN. Se probaron varias temperaturas de hibridación que oscilan entre los 55°C y los 62°C, y adquirieron los mejores resultados a 60°C, con tiempos de hibridación y elongación de 30 segundos. Se aumentó también el número de ciclos desde 30 hasta 35.

Para la tipificación se emplearon 2.5mL del producto de PCR, la corrida se realizó en geles de acrilamida denaturalizantes (6M de urea) al 6% a 40W de potencia, en cada caso se emplearon los marcadores de peso molecular correspondientes con el rango de talla mostrado por los diferentes alelos en cada locus. La detección se realizó con el empleo de métodos no radiactivos como es la tinción con plata, que además de eliminar el riesgo que conlleva la manipulación de isótopos radiactivos disminuye en gran medida el costo económico de la tipificación (5).

Teniendo en cuenta los resultados que se obtienen con el empleo de estos marcadores, se recomienda continuar trabajando, con la idea de introducir este método como prueba de los registros de filiación y en las disputas de paternidad en caninos.

REFERENCIAS

1. Jean Pierre, H. (1987): A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acid Research*. 15: 9611.
2. Jefreys, A.J.; Wilson, V.; Thein, S.L. (1985): Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*. 314: 67-73.
3. Koreth, J.; O'Leary, J.; O'D. McGee, J. (1996): Microsatellites and PCR genomic analysis. *Journal of Pathology*. 178: 239-248.
4. Litt, M.; Luty, J.A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*. 44: 397-401.
5. Osta, R.; Martín, I.; Marcos, S.; Rodellar, C.; Zaragosa, P. (1994): Utilización de métodos no radiactivos en la detección del polimorfismo de microsatélites a nivel del DNA. *XXIX Jornadas de Genética Luso-Españolas*.
6. Zajk, I.; Mellersh, E.; Kelly, P.; Sampson, J. (1994): A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. *The Veterinary Record*.
7. Zajk, I.; Mellersh, E.; Kelly, P.; Sampson, J. (1997): Variability of canine microsatellites within and between different dogs breeds. *Mammalian Genome* 8: 182-185.

(Recibido 7-11-2000; Aceptado 22-12-2000)