

EMPLEO DE LOS MICROSATÉLITES PARA DETERMINAR PATERNIDAD EN BOVINOS CUBANOS

Arianne Sanz*, Odalys Uffo*, Ileana Miranda** y Siomara Martínez*

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

RESUMEN: Se analizó el polimorfismo de ocho microsatélites bovinos recomendados por la ISAG para pruebas de paternidad en 20 animales pertenecientes a una familia, en la que está involucrada un animal de alto valor genético con elevada producción de leche de alta calidad. Se calcularon las frecuencias alélicas, la heterocigocidad y el contenido de información polimórfica (PIC), evidenciándose que el microsatélite SPS 115 es el menos polimórfico (PIC=0.3515) y el TGLA 122 el más polimórfico (PIC=0.7052). Los valores promedios de HET=0.6259 y PIC=0.5582 demuestran que estamos en presencia de una población poco polimórfica, lo que hace comprobar la relación filogenética de estos animales.

(Palabras clave: microsatélites; paternidad; PIC)

USE OF MICROSATELLITES FOR PATERNITY TESTING IN CUBAN BOVINES

ABSTRACT: Since microsatellites have assumed an important role in paternity testing, the polymorphism of 8 microsatellites recommended by the ISAG in 20 animals belonging to a family, where there is an animal of a high genetic value with an elevated milk and fat production, was analyzed. Allele frequencies, heterozygosity and polymorphism information content (PIC) were calculated. The SPS 115 was the least polymorphic microsatellite (PIC=0.3515) and TGLA 122 the most polymorphic microsatellite (PIC=0.7052). Mean values of heterozygosity and PIC (0.6259 and 0.5582 respectively) indicate that the population has a low polymorphism, checking the genetic relationship of these animals.

(Key words: microsatellites; paternity testing; PIC)

INTRODUCCIÓN

Debido al desarrollo que ha adquirido la industria ganadera en Cuba, se ha hecho necesario el empleo de nuevos métodos de identificación de individuos, pues los tradicionales, como son la determinación de grupos sanguíneos y el polimorfismo bioquímico, tienen bajo poder de discriminación y un número limitante de tejidos para hacer las determinaciones. Gracias al desarrollo de la biotecnología, el surgimiento de los marcadores moleculares y el conocimiento del genoma bovino, se desarrollan cada vez más los métodos de identificación genética. Los marcadores moleculares, y dentro de estos los microsatélites (9), han adquirido

notable importancia en los estudios de paternidad por su alto valor de fiabilidad (95-98%) (8); estos últimos consisten en secuencias cortas de 1 a 4 nucleótidos repetidos entre 10 y 50 veces a lo largo del genoma de la especie y están flanqueados por regiones altamente conservadas, por lo que es posible detectarlos por PCR. Los resultados son fáciles de interpretar, pues de los alelos presentes en un microsatélite dado, uno es heredado de la madre y otro del padre, por tanto, al comparar las tallas de los fragmentos obtenidos por PCR con el uso de oligonucleótidos específicos, es posible asignar o excluir la paternidad (13). Además, en los últimos años se han convertido en los marcadores más utilizados en estudios de ligamiento (13), mapeo de genes (7), estudios de poblaciones (3) y

estudios de evolución (6). En la actualidad se conocen más de 1000 microsatélites (2; 7), algunos recomendados por la ISAG (1) para estudios de paternidad.

El objetivo de la presente investigación fue comprobar la relación filogenética de 20 animales pertenecientes a una familia en la que está involucrada un animal de alto valor genético con una producción de leche de elevada calidad. Para esto se emplearon ocho microsatélites recomendados por la ISAG (1).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales:

Las muestras de sangre fueron tomadas a partir de 20 animales relacionados filogenéticamente. En esta familia está involucrado un animal de alto valor genético, que produjo leche con alto contenido de proteínas y grasas, además de algunos de sus descendientes.

2. Extracción del material genético:

La extracción del ADN se realizó a partir de sangre periférica que contenía EDTA 500mM como anticoagulante, siguiendo el método descrito por Sambrook *et al.* (12) con algunas modificaciones. Una vez obtenido el material genético se purificó por diálisis contra buffer Tris-EDTA, pH 7.4, y se conservó a -20°C.

3. Marcadores microsatélites:

Se emplearon ocho microsatélites bovinos (Tabla 1) recomendados por la ISAG (International Society for Animal Genetics) para pruebas de paternidad. Los

oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR de las regiones polimórficas fueron sintetizados en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Cuba, las secuencias se listan en la Tabla 1.

4. Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa:

La reacción de amplificación procedió en 25µL que contenían 100ng de ADN genómico, 100µM de cada dNTP, 1U de Taq Polimerasa (AmpliCEN), 0.4µM de cada cebador y 0.04µM del cebador directo marcado con [γ -³²P] ATP (CENTIS). La reacción se desarrolló en equipo MJ Research Technology, 96 well, V bottom plates, a temperaturas de alineamiento según tabla 1.

5. Determinación de los genotipos:

Se mezclaron 5µL del producto amplificado con buffer de carga STR 2X (10mM NaOH, 95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF). Las muestras fueron separadas en geles desnaturalizantes al 6% con urea 6M, corridas a 40W en fuente LKB. Las bandas de ADN fueron visualizadas por autorradiografía, el tipaje se realizó por comparación entre líneas empleando patrones de peso molecular, asignándosele números a cada uno de los alelos obtenidos.

6. Cálculos estadísticos:

Se realizaron los cálculos de heterocigocidad y Contenido de Información Polimórfica (PIC) según Bolstein *et al.* (3), empleándose las frecuencias alélicas para n=20.

TABLA 1. Características de los microsatélites empleados./ *Characteristics of used microsatellites*

Nombre del microsatélite	Cromosoma	Rango de tallas	Secuencias de los oligonucleótidos (5´-3´)	Temp. Alineamiento (°C)
BM 1824	1	178-190pb	P1: GAGCAAGGTGTTTTCCAATC P2: CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	58
BM 2113	2	125-143pb	P1: GCTGCCTTCTACCAATACCC P2: CTCCTGAGAGAAGCAACACC	58
SPS 115	15	240-262pb	P1: AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG P2: AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG	58
ETH 10	5	210-226pb	P1: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA P2: CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	67
ETH 225	9	140-156pb	P1: GATCACCTTGCCACTATTTCTCT P2: ACATGACAGCCAGCTGCTACT	67
TGLA 122	21	130-164pb	P1: CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC P2: AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	60
TGLA 126	20	109-127pb	P1: CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT P2: TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	60
TGLA 227	18	78-104pb	P1: CGAATTCCAAATCTGTAAATTTGCT P2: ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	60

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2 p_i^2 p_j^2$$

siendo k el número de alelos y p_i, p_j las frecuencias alélicas del i ésimo y j ésimo alelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinaron por autorradiografía los genotipos que portan los animales para cada uno de los ocho microsatélites amplificados. En la Tabla 2 aparecen los valores de frecuencias alélicas encontrados para cada uno de los loci y los resultados de los cálculos de heterocigidad y PIC. Todos los microsatélites resultaron ser polimórficos, con un número de alelos entre

2 y 6. Por la presencia de alelos de los presuntos padres en sus supuestos hijos, se pudo comprobar que están realmente emparentados, resultado que fue confirmado para los ocho loci tipificados. Todos los alelos se correspondieron en movilidad y talla con los encontrados en otras razas bovinas (3,7,11) y no aparecieron en nuestras muestras alelos no reportados con anterioridad.

Los resultados obtenidos de PIC y HET indican que el microsatélite menos polimórfico es el SPS 115 con el menor valor de PIC= 0.3514, esto coincide con lo reportado por Peelman *et al.* (11), y el más polimórfico es el TGLA 122, con el valor más elevado de PIC=0.7052 dentro de la muestra familiar analizada. La fórmula para calcular PIC toma en consideración el

TABLA 2. Caracterización de ocho microsatélites./ *Characterization of eight microsatellites*

Microsatélite	Alelos	Frecuencias alélicas	HET	PIC
BM 1824	1	0.1	0.57375	0.4879
	2	0.525		
	3	0.375		
BM 2113	1	0.025	0.65625	0.58975
	2	0.3		
	3	0.225		
	4	0.45		
SPS 115	1	0.65	0.455	0.35148
	2	0.35		
ETH 10	1	0.25	0.53125	0.46826
	2	0.625		
	3	0.125		
ETH 225	1	0.075	0.74375	0.70094
	2	0.05		
	3	0.25		
	4	0.35		
	5	0.025		
	6	0.25		
TGLA 122	1	0.075	0.74625	0.70518
	2	0.175		
	3	0.325		
	4	0.325		
	5	0.075		
	6	0.025		
TGLA 126	1	0.4	0.58	0.4918
	2	0.1		
	3	0.5		
TGLA 227	1	0.05	0.72125	0.66978
	2	0.25		
	3	0.325		
	4	0.325		
	5	0.05		

HET: Heterocigidad.

PIC: Contenido de Información Polimórfica

número de alelos presente en cada locus y la frecuencia de dichos alelos; por tanto, los loci con un elevado número de alelos muestran valores de PIC mayores, aunque es posible encontrar valores menores de PIC aún cuando el número de alelos es elevado, si uno de estos predomina (5). Los valores promedios de $HET=0.6259$ y $PIC=0.5582$ fueron comparados con los reportados por otros autores (11), se demuestra que trabajamos con una muestra familiar poco polimórfica, por ser relativamente pequeña y cerrada con un número mínimo de padres.

Se ha reportado el uso de los microsatélites para pruebas de paternidad en ganado y otros animales domésticos (10), revelando su utilidad en especies de mamíferos genéticamente relacionadas.

En conclusión, el grupo de microsatélites empleado puede ser utilizado para pruebas de paternidad por el grado de polimorfismo detectado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Dr. Raúl Ferrera PhD y Lic. Giosvany González del laboratorio de Genética del Hospital Hermanos Ameijeiras por la colaboración prestada en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. 25th Conference, Tours, France. International Society for Animal Genetics. (1994): International DNA Comparison Test.
2. Barendse, W.; Armitage, S.M.; Kossarek, L.M. (1994): A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics*. 6: 227-235.
3. Bolstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M. y Davis, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314-31.
4. Buchanan, F.C.; Littlejohn, R.P.; Galloway, S.M. y Crawford, A.M. (1993): Microsatellites and associated repetitive elements in the sheep genome. *Mamm. Gen.* 4: 258-264.
5. Buchanan, F.C.; Thue, T.D. (1998): Intrabreed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 78: 425-428.
6. Ellegren, H.; Moore, S.; Robinson, N.; Byrne, K.; Ward, W.; Sheldon, B.C. (1997): Microsatellite Evolution- A Reciprocal Study of Repeat Lengths at Homologous Loci in Cattle and Sheep. *Mol. Biol. Evol.* 14(8): 854-860.
7. Kappes, S.M.; Keele, J.W.; Stone, R.T.; McGraw, R.A.; Sonstegard, T.S.; Smith, T.P.L.; Lopez-Corrales, N.L. y Beattie, C.W. (1997): A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genet. Res.* 7: 235-249.
8. Koreth, J.; O'Leary, J. y Mcgee, O.D. (1996): Microsatellites and PCR genomic analysis. *J. Pathol.* 178: 239-248.
9. Litt, M. y Luty, J.A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeated within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
10. 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.
11. Peelman, L.J.; Mortiaux, F.; Van Zeveren, A.; Dansercoer, A.; Mommens, G.; Coopman, F.; Bouquet, Y.; Renaville, R. y Portetelle, D. (1998): Evaluation of the genetic variability of 23 microsatellite markers in four Belgian cattle. *Anim. Gen.* 29: 161-167.
12. Sambrook, J.; Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A laboratory manual. Second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
13. Schumtz, S.M.; Marquess, F.L.S.; Berryre, T.G. y Morker, J.S. (1995): DNA marker-assisted selection of the polled condition in Charolais cattle. *Mamm. Gen.* 6: 710-713.
14. Zajk, I.; Mellersh, C.; Kelly, E.P. y Sampson, J. (1994): A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. *Veterinary Record*. 135: 545-547.

(Recibido 2-2-2001; Aceptado 18-9-2001)