UTILIZACIÓN DE MARCADORES POLIMÓRFICOS PARA IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL Y PRUEBAS DE PATERNIDAD EN POBLACIONES CONSANGUINEAS

Laura Altet, Olga Francino, Armand Sánchez
Unitat de Genètica i Millora. Facultat de Veterinària.
Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

INTRODUCCIÓN

La identificación individual y las pruebas de paternidad en especies domésticas se basan en la utilización de marcadores de ADN que presentan elevados niveles de polimorfismo entre individuos de una misma especie. Para el estudio de estos marcadores es indispensable conocer sus frecuencias alélicas a partir de las cuales podemos calcular el P.I.C (índice de polimorfismo de cada marcador), la probabilidad de exclusión -P.E- (probabilidad de que una serie de alelos codominantes, de frecuencias conocidas, detecten un falso progenitor) y la P.S (probabilidad genética de distinguir individuos cercanos entre si). Sin embargo, en especies donde el nivel de consanguinidad puede ser elevado, como en el caso de la especie canina, la utilización de estos marcadores puede verse limitada. Con el objetivo de evaluar este parametro en la especie canina se ha realizado un estudio comparativo del polimorfismo de ocho marcadores en una población de animales independientes (perros no emparentados de distintas razas) con una población cerrada de animales de raza Rottweiler. Se han utilizado dos tipos diferentes de marcadores: seis microsatélites y el gen DQB del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).

Los microsatélites son repeticiones en tándem de 2 a 5 nucleótidos, uniformemente distribuidos por todo el genoma, que presentan una elevada variabilidad, entre individuos, en el número de repeticiones. Cuatro de los seis microsatélites evaluados son repeticiones $(GT)_n$ (CPH-2, CPH-5, CXX410 y CXX474) y dos de ellos son repeticiones $(GATA)_n$ (CXX2001 y CXX2054).

Los genes de clase II del MHC codifican glicoproteínas de membrana responsables de la presentación de antígenos a los linfocitos T. Estas glicoproteínas son heterodímeros formados por dos cadenas -α y β- codificadas cada una de ellas por un gen distinto -DQA y DQB-. El dominio extracelular de la proteína, que forma el lugar de reconocimiento y unión del antígeno, presenta un elevado nivel de polimorfismo entre individuos de una misma especie, proporcionando el mecanismo por el que diferentes tipos de moléculas de clase II se unen selectivamente a péptidos antigénicos de diferente secuencia. Esta variabilidad determina la especificidad de la respuesta inmune que está relacionada con la resistencia o susceptibilidad a determinadas enfermedades, lo que proporciona un valor añadido a la utilización de este gen como marcador.

MATERIAL Y MÉTODOS

La extracción del ADN genómico se realiza a partir de 0'6ml de sangre. Después de sucesivos lavados con TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM) hasta conseguir un pelet blanco de leucocitos, se incuba en 0'1ml de tampón de lisis (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 0'5% Tween-20 y 100 μg/ml de proteinasa K) a 56°C durante 3-4h. El ADN se purifica con cloroformo:isoamilalcohol (24:1) eliminando las proteínas y los detritus celulares, se precipita con etanol y se resuspende en un volumen de 100 μl de TE.

Las reacciones de PCR para cada uno de los seis microsatélites han sido optimizadas de tal manera

que difieren únicamente en la temperatura de unión del cebador -55° o 58°C-. La reacción se realiza en un volumen total de 50 μl que contienen: tampón de PCR (x1), 0'5 μM de cada cebador, 0'2 mM de cada dNTP, 1'5 mM de $MgCl_2$, 1'25U de Taq polimerasa y 100-200 ng de ADN genómico. El ciclo térmico es de 3' a 94°C seguido de 25 ciclos de 1' a 94°C, 2' a 55°C (CXX410, CXX2001, CXX2054) o 58°C (CPH-2, CPH-5, CXX474) y 2' a 72°C. La reacción finaliza con un ciclo de 5' a 72°C como extensión final. El resultado de la reacción de PCR se comprueba en un gel de agarosa al 1'5% y se analiza en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 10% en los microsatélites de tipo $(GT)_n$ y al 8% en los de tipo $(GATA)_n$. El tiempo de recorrido del gel es de 6h 30' a 8°C con una intensidad constante de 15 mA. El marcador utilizado es un 6 bp ladder que va desde 90 a 280 pares de bases. Posteriormente el gel se tiñe en una solución de bromuro de etidio.

El segundo exón del gen DQB ha sido amplificado con cebadores derivados de secuencias que corresponden a regiones conservadas entre diferentes especies domésticas. La reacción de PCR se realiza en un volumen total de 50 μl que contiene: tampón de PCR (x1), 1mM de $MgCl_2$, 0'1 μM de cada cebador, 0'2 mM de cada dNTP, 1'25U de Taq polimerasa y 100-200 ng de ADN genómico. El ciclo térmico es de 3' 94°C seguido de 31 ciclos de 1' a 94°C, 1' 30'' a 55°C y 2' a 72°C con una extensión final de 5' a 72°C. El producto de la PCR se comprueba en un gel de agarosa al 1'5% y es digerido con las endonucleasas de restricción Rsa I y Asp HI. El producto de las digestiones se analiza como se ha descrito anteriormente para los microsatelites utilizando un gel de PAGE no-desnaturalizante al 8% y limitando el tiempo de electroforesis a 3h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La optimización de los seis microsatélites en sólo dos condiciones de PCR permite determinar el genotipo de varios loci, para un número reducido de animales, de forma simultanea, facilitando la resolución de casos de paternidad.

Los resultados obtenidos del estudio comparativo de los ocho marcadores en las dos poblaciones analizadas se presentan en la tabla 1. Los microsatélites evaluados siguen presentado una elevada variabilidad en una población cerrada de animales de raza Rottweiler, obteniendose una Probabilidad de Exclusión combinada de 0'973 y una Probabilidad combinada de diferenciar genéticamente dos indivuduos estrechamente relacionados (PS) de 0'993. Al añadir los patrones de RFLP (polimorfismo de restricción) del gen DQB estas probabilidades aumentan a 0'982 y 0'997 respectivamente. Estos resultados validan la utilización de estos marcadores en la identificación individual y las pruebas de paternidad en una población consanguinea.

Cabe destacar que analizados 44 animales en la población de Rottweilers únicamente se observan dos de los siete patrones de restricción para el enzima Rsa I en el segundo exón del gen DQB, con unas frecuencias muy equilibradas, mientras que en la población de animales independientes, donde solo se han analizado 19 individuos, aparecen cinco de los siete patrones de restricción existentes. Esta disminución de la variabilidad podría ser consecuencia de la consanguinidad de la población o a un posible predominio de ciertos patrones, y por tanto de alelos concretos, en algunas de las razas caninas que podría estar relacionada con la diferente resistencia-susceptibilidad que presentan las distintas razas a determinadas enfermedades relacionadas con el sistema inmune.

Tabla 1. Frecuencias alélicas, PIC, P.E y P.S para las dos poblaciones analizadas. En negrita se presentan los resultados en la población cerrada de animales de raza Rottweiler.

	N	ALELOS	FRECUENCIAS		PIC	P.E	P.S
CPH2	59	93	0.025		0,716	0,533	0,602
	90	95	0.110	**0.116**	**0,616**	**0,413**	**0,545**
		97	0.262	**0.311**			
		99	0.372	**0.450**			
		101	0.008				
		103	0.033				
		105	0.016				
		107	0.161	**0.122**			
		111	0.008				
CPH5	56	113	0.107	**0.038**	0,745	0,566	0,619
	90	115	0.276	**0.394**	**0,695**	**0,502**	**0,590**
		117	0.241	**0.205**			
		119	0.241	**0.183**			
		121	0.009				
		123	0.125	**0.177**			
CXX	53	98	0.009		0,773	0,623	0,631
410	**90**	102	0.037		**0,640**	**0,438**	**0,559**
		104	0.028				
		110	0.141	**0.272**			
		116	0.387	**0.438**			
		118	0.037	**0.011**			
		120	0.037				
		122	0.066				
		124	0.151	**0.188**			
		126	0.066	**0.083**			
		128	0.019	**0.005**			
		130	0.019				
CXX	57	110	0.043	**0.044**	0,781	0,623	0,637
474	**90**	112	0.123	**0.116**	**0,697**	**0,512**	**0,591**
		114	0.307	**0.383**			
		116	0.114	**0.105**			
		118	0.140				
		120	0.026				
		122	0.026	**0.055**			
		124	0.219	**0.294**			
CXX	52	128	0.009	**0.005**	0,780	0,629	0,635
2001	**90**	132	0.365	**0.450**	**0,681**	**0,496**	**0,579**
		136	0.115				
		140	0.048				
		144	0.163	**0.216**			
		148	0.077	**0.072**			
		152	0.086	**0.027**			
		156	0.086	**0.144**			
		160	0.048	**0.083**			
CXX	48	151	0.021	**0.013**	0,747	0,586	0,616
2054	**76**	155	0.166	**0.289**	**0,523**	**0,329**	**0,483**
		159	0.406	**0.572**			
		163	0.031	**0.006**			
		167	0.031				
		171	0.104	**0.006**			
		175	0.135	**0.052**			
		179	0.062	**0.059**			
		183	0.021				
		187	0.021				
DQB	19	1	0.184		0,751	0,572	0,622
Rs	44	3	0.263	0.545	0,374	0,186	0,404
		4	0.105				
		5	0.210	0.454			
		6	0.237				
DQB	19	1	0.789	0.544	0,278	0,138	0,291
As	45	3	0.210	0.455	0,374	0,186	0,404

BIBLIOGRAFÍA

- BOTSTEIN y col.: *Am J Hum Genet* 32:314-331,1980.
- A. JAMIESON: *Anim Genet* 25, Supplement 1,37-44,1994.
- M.FREDHOLM y col.: *Anim Genet* 27:19-23,1996.