

# USO DEL FINGERPRINTING DE ADN PARA ASIGNAR PATERNIDAD EN UN REBAÑO CON CASOS DE MALFORMACIÓN CONGÉNITA DE LA PARED ABDOMINAL

N. Gorla<sup>1</sup>, Dr. Cs. Biol.; F. Benavides<sup>2</sup>, M.V.; M. Salaverri<sup>2</sup>, Lic. Cs. Biol.; R. Ludueña, M.V.; N. Grandoli, M.V.; E. Corley<sup>3</sup>, Lic. Cs. Biol.; I. Larripa<sup>2</sup>, Dr. Cs. Biol. 1998. Valdivia. Arch. Med. Vet.30(2):151-155.

<sup>1</sup>Farmacología, Fac. de Agr. y Vet., Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), Argentina.

<sup>2</sup>Depto. de Genética, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Capital Federal, Argentina.

<sup>3</sup>PCGen SRL, Capital Federal, Argentina.

[www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Volver a: [Bovinos en general](#)

## RESUMEN

Se evaluó la efectividad del fingerprinting de ADN para determinar la paternidad en un rebaño bovino con casos de malformación congénita de la pared abdominal. La técnica elegida fue el fingerprinting multilocus con la sonda (CAC)<sub>5</sub>. Las muestras de ADN fueron obtenidas de sangre periférica por los métodos habituales, digeridas con la enzima de restricción Hae III, transferidas a membranas de nylon e hibridadas. Se analizaron en forma visual los patrones de banda obtenidos y los datos fueron procesados por el programa "PATER". A pesar de la alta consanguinidad de las razas estudiadas, la probabilidad de paternidad (W) obtenida fue en un caso W = 0.80 y en el otro W = 0.93, lo que demostró la efectividad de la sonda (CAC)<sub>5</sub> para determinar la paternidad de un mismo toro sobre los dos terneros afectados.

*Palabras claves:* Fingerprinting, minisatélites, paternidad, bovinos, malformación congénita.

## INTRODUCCIÓN

La ocurrencia de cuatro casos de terneros afectados congénitamente con malformación de la pared abdominal, provenientes de distintas madres y de cuatro toros, padres putativos, sugirió establecer la relación genética paterna de los terneros.

Las pruebas de identidad y determinación de paternidad han requerido siempre del uso de polimorfismos de origen genético. Los primeros utilizados fueron los grupos sanguíneos, todavía en uso en bovinos y equinos, seguidos por los de proteínas, enzimas y otros marcadores de origen inmunológico. Los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs: Restriction Fragments Length Polymorphism) han sido usados extensamente para el estudio de variaciones genéticas en poblaciones humanas (Wainscoat y col., 1986). Sin embargo, la variabilidad genética general del ADN humano y animal es baja, siendo de uso limitado en análisis de paternidad. Las regiones hipervariables no codificantes del ADN humano (Wyman y White, 1980) denominadas "minisatélites", son marcadores altamente informativos en pruebas de identificación.

Las sondas moleculares desarrolladas por Jeffreys y col. (1985) a partir de secuencias repetitivas de un intrón de la mioglobina humana, dieron origen a la técnica conocida como "fingerprinting de ADN" que ha revolucionado la medicina forense y los estudios de paternidad en todo el mundo (Jeffreys y col., 1985, 1991); y que se ha empleado extensamente en trabajos de investigación en vegetales, animales domésticos y seres humanos (Georges y col., 1988b; Buitkamp y col., 1991; Ellegren y col., 1992; Schwaiger y col., 1992). Rápidamente se fueron descubriendo otras sondas multilocus: Per,  $\alpha$ -globina 3' HVR, M13 (Vassart y col., 1987), y oligonucleótidos sintéticos simple cadena tipo (CAC)<sub>5</sub> (Schafer y col., 1988).

En el presente trabajo se empleó el fingerprinting de ADN multilocus con la sonda (CAC)<sub>5</sub> para determinar paternidad en cuatro toros de un rebaño Cebú/Hereford y dos terneros afectados con malformación abdominal congénita.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de sangre con anticoagulante (EDTA 5%) de dos terneros malformados (foto 1), de las madres correspondientes y los cuatro toros padres putativos.

Los terneros presentaban defecto de cierre de la línea alba desde el cartílago xifoides al pubis, con músculos rectos y abdominales normales. Esta falla de formación de la pared abdominal ventral resultó en la extrusión del contenido abdominal como se observa en la foto 1.

Los ADN de las ocho muestras fueron extraídos con fenol-cloroformo. La digestión se realizó según las especificaciones del fabricante con 10 unidades de la enzima de restricción *Hae III*<sup>1</sup> µg de ADN. Las muestras individuales de 10 µg de ADN digerido se corrieron en geles de agarosa (0.8%-1%) de 25 cm de longitud a 15 volts durante 48 hs, con buffer de corrida TBE 1X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 30 min para comprobar la digestión. Luego de los respectivos lavados de desnaturalización y neutralización del gel se transfirieron las muestras de ADN a una membrana de nylon por la técnica de Southern blot (Maniatis y col., 1982). El ADN se fijó a las membranas a 80°C durante 2 hs. La sonda (CAC)<sub>5</sub> fue sintetizada comercialmente<sup>2</sup> y conjugada con fosfatasa alcalina. Se prehibridaron las membranas con bloqueante "QY blocking"<sup>3</sup> durante 45 min a t° de hibridación. La hibridación se realizó con solución "QY low stringency"<sup>4</sup> a 35°C durante 45 min. Los lavados realizados fueron: 4 lavados de 5 min con NaCl 0.75 M, 1% SDS a t° de hibridación, 1 lavado de 5 min con NaCl 0.75 M y 2 lavados de 5 min con Dietanolamina 100 mM, MgCl 1 mM a t° ambiente. La membrana de nylon se embebió con sustrato quimioluminiscente "Quantum Yield Chemiluminescent"<sup>5</sup> y se expuso a una placa radiográfica por espacio de 1 hora a 37°C. La evaluación de los patrones de bandas (mayores a 2 kb) se hizo en forma visual, y los datos fueron procesados con el programa "PATER" (Pena y Nunes, 1990).



Foto 1. Ternero Cebú/Hereford con malformación congénita de la pared abdominal.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

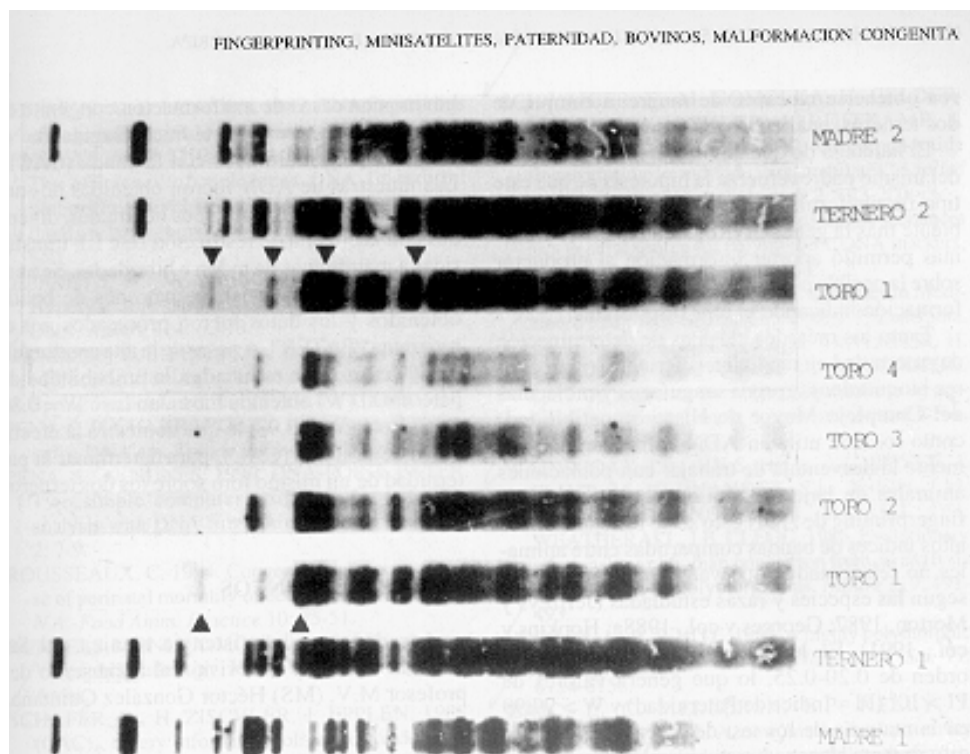


Foto 2. Fingerprinting de ADN de dos terneros Cebú/Hereford con hernia abdominal congénita, sus dos madres y los cuatro toros (padres putativos), usando sonda de oligonucleótidos (CAC)<sub>5</sub>.

El fingerprint es un patrón de bandas único y específico del ADN de un individuo y en este trabajo se utiliza para asignar el origen paterno de terneros con malformación congénita de la pared abdominal. En la foto 2 se

muestra el Fingerprinting de ADN de los animales estudiados. Las bandas que migraron a la misma altura y con la misma intensidad de hibridación se consideraron como un mismo alelo de un mismo locus (Pena y Chakraborty, 1994). El análisis estadístico se efectuó banda por banda. El procedimiento consistió en determinar aquellas bandas presentes en la cría que no pudieron asignarse a la madre ("bandas testigo") y evaluar cuántas de éstas podían ser detectadas en el padre presunto.

Las probabilidades de paternidad (W) fueron evaluadas con la ayuda del programa PATER y dieron los siguientes resultados: se adjudicó la paternidad de ambos productos al toro 1, con valores de  $W = 0.93$  para el trío toro 1/ternero 2/madre 2 (las 4 bandas testigo detectadas en la cría se encontraban presentes en el padre presunto) y  $W = 0.80$  para el trío toro 1/ternero 1/madre 1 (las 2 bandas testigo observadas en la cría estaban presentes en el padre presunto). No pudo observarse ninguna banda testigo en los patrones de bandas de los otros 3 toros del rebaño, por lo que fueron excluidos como posibles padres, afirmando que los dos terneros afectados provenían de un mismo padre.

Esta malformación podría enmarcarse como una hernia ventral congénita, según Runnels (1960) o dentro de las anomalías externas del tronco descritas como Hernia Umbilical, Onfalocèle y Gastriquisis por Rousseaux (1994). Otro autor considera que la gran abertura xifopubiana con distopia visceral puede catalogarse como celoschisis (Rousseaux, 1994).

El desarrollo anormal depende de un componente genético del feto y del efecto del ambiente en el cual se desarrolla (Rousseaux, 1994). Esta supuesta herencia multifactorial de las malformaciones congénitas, también aceptada en el hombre (Gelehrter y Collins, 1990; Thompson y Thompson 1991) y la participación de distintas madres en los cuatro casos observados, sugirió la búsqueda de un aporte genético paterno en las malformaciones. Desafortunadamente sólo pudieron obtenerse muestras de sangre, a campo, de dos terneros, analizados en el presente trabajo.

El hallazgo de que ambos terneros provenían del mismo padre refuerza la hipótesis de que este tipo de malformaciones es el producto del ambiente más la genética (Rousseaux, 1994) y además permitió aportar información al productor sobre la posible contribución genética en esta malformación indicando el toro responsable.

Tanto los métodos clásicos de determinación de paternidad en medicina veterinaria (marcadores bioquímicos, grupos sanguíneos y moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad) como los que utilizan ADN enfrentan generalmente la desventaja de trabajar con poblaciones animales de baja variabilidad genética. En el fingerprinting de ADN esto se ve reflejado en los altos índices de bandas compartidas entre animales no relacionados que van entre 0.40 y 0.70, según las especies y razas estudiadas (Jeffreys y Morton, 1987; Georges y col., 1988a; Hopkins y col., 1991). En humanos estos índices son del orden de 0.20-0.25, lo que genera valores de  $PI > 104$  ( $PI = \text{Índice de Paternidad}$ ) y  $W > 99.99$  en la mayoría de los test de paternidad, niveles difícilmente alcanzados en animales domésticos. Sin embargo, dado su poder de información, su estabilidad somática y su herencia mendeliana, el fingerprinting de ADN es una de las mejores pruebas disponibles en medicina veterinaria para los estudios de paternidad, la individualización de embriones y los controles de identidad en semen. Debido al bajo desarrollo de las sondas "single-locus" en especies domésticas, la técnica de elección sigue siendo el fingerprinting con sondas multilocus como la empleada en este trabajo. En los últimos años la gran difusión de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido la incorporación de nuevos marcadores de ADN como son los minisatélites (SSLP) (Tautz, 1989) y el AP-PCR "arbitrary primed PCR". El uso de los minisatélites para la certificación de paternidad se ha generalizado en humanos y en las distintas especies de animales domésticos, convirtiéndose actualmente en el procedimiento de mayor difusión (Gill y col., 1994; Zajc y col., 1994).

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la asistencia técnica del Sr. Demián Casalla y la revisión al manuscrito del profesor M.V. (MS) Héctor González Quintana.

- 1 Gibco-BRL, USA.
- 2 Biodynamics SRL, Buenos Aires.
- 3 Promega, USA.
- 4 Promega, USA.
- 5 Promega, USA.

## BIBLIOGRAFIA

BUITKAMP, J., H. AMMER, H. GELDERMANN. 1991. DNA fingerprinting in domestic animals, *Electrophoresis* 12: 169-174.

- ELLEGREN, H., L. ANDERSSON, M. JOHANSSON, J. SANDBERG. 1992. DNA fingerprinting in horses using a simple (TG)<sub>n</sub> probe and its application to population comparisons, *Animal Genet.* 23: 1-9.
- GELEHRTER, T., F. COLLINS, 1990. Principles of Medical Genetics, Williams and Wilkins, Baltimore.
- GEORGES, M., P. HILBERT, S. LEQUARRE, R. HANSET, G. VASSART. 1988a. Use of DNA bar codes to resolve a canine paternity dispute, *JAVMA* 193: 1095-1098.
- GEORGES, M., S. LEQUARRE, M. CASTELLI, R. HANSET, G. VASSART. 1988b. DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes, *Cytogenet. & Cell Genet.* 47:127-131.
- GILL, P., P.L. IVANOV, C. KIMPTON, R. PIERCY, G. TULLY, I. EVETT, E. HAGELBERG, K. SULLIVAN. 1994. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis, *Nat. Genet.* 6: 130-135.
- HOPKINS, B., F. O'CONNELL, J. HOPKINS. 1991. Use of DNA fingerprinting in paternity analysis of closely-related Exmoor ponies, *Equine Vet. J.* 23: 277-279.
- JEFFREYS, A., D. MORTON. 1987. DNA fingerprints of dogs and cats, *Animal Genet.* 18: 1-15.
- JEFFREYS, A., M. TURNER, P. DEBENHAM. 1991. The efficiency of multilocus DNA fingerprint probes for individualization and establishment of family relationships, *Am. J. Hum. Genet.* 48: 824-840.
- JEFFREYS, A., V. WILSON, S. THEIN. 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA, *Nature* 314: 67-73.
- MANIATIS, T., E. FRITSCH, J. SAMBROOK. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- PENA, S., R. CHAKRABORTY. 1994. Paternity testing in the DNA era, *Trends in Genet.* 10: 204-209.
- PENA, S., A. NUNES. 1990. DNA-POP & PATER. Two simple computer programs for paternity analysis with DNA fingerprinting, *Fingerp. News* 2: 7-9.
- ROUSSEAU, C. 1994. Congenital defects as a cause of perinatal mortality of beef calves, *Vet. Clinics N.A.-Food Anim. Practice* 10: 35-51.
- RUNNELS, MONLUX-MONLUX. 1965 Principles of Veterinary Pathology, Iowa State University Press, Ames.
- SCHAFER, R., H. ZISCHLER, J. EPPLIN. 1988. (CAC)<sub>5</sub>, a very informative oligonucleotide probe for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res.* 16: 5196.
- SCHWAIGER, F., M. GOMOLKA, H. GELDERMANN, H. ZISCHLER, J. BUITKAMP, J. EPPLIN, H. AMMER. 1992. Oligonucleotide fingerprinting to individualize ungulates, *Applied and Theoretical Electrophoresis* 2: 193-200.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers, *Nucleic Acid Res.* 17: 6463-6471.
- THOMPSON, THOMPSON 1991. Genetics in Medicine, 5th ed., W.B.Saunders Company, Philadelphia.
- VASSART, G., M. GEORGES, R. MONSIEUR, H. BROCAS, A. LEQUARRE, D. CHRISTOPHE. 1987. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA, *Science* 235: 683-684.
- WAINSCOAT, J.S., A.V.S. HILL, A.L. BOYCE, J. FLINT, M. HERNANDEZ, S.L. THEIN, J.M. OLD, J.R. LYNCH, A.G. FALUSI, D.J. WEATHERALL, J.B. CLEGG. 1986. Evolutionary relationships of human population from an analysis of nuclear DNA polymorphisms, *Nature* 319: 491-493.
- WYMAN, A., R. WHITE. 1980. A highly polymorphic locus in human DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 6754-6758.
- ZAJC, I., C. MELLERSH, E.P. KELLY, J. SAMPSON. 1994. A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences, *Vet. Rec.* 135: 545-547.

[Volver a: Bovinos en general](#)