

# Primeros estudios moleculares en el perro Cimarrón del Uruguay

Llambí, S.<sup>1</sup>; Separovich, M.J.<sup>1</sup>; Fernández, G.<sup>2</sup>; Arruga, M.V.<sup>3</sup>.

El presente trabajo lo dedicamos en memoria de nuestra amiga y colega la Dra. Claudia Silveira, que permanecerá por siempre entre nosotros como guía espiritual para seguir en el camino que ella impulso para investigar sobre esta raza canina

## RESUMEN

El perro Cimarrón es la única raza canina autóctona en Uruguay. Dentro de un programa de conservación y con objeto de conocer la variabilidad genética de esta raza es importante el análisis del ADN y dentro por consiguiente la utilización de marcadores moleculares de ADN entre los que se encuentran los denominados RAPD.

El objetivo del presente trabajo es evaluar una serie de 10 marcadores RAPD en muestras de ADN de perros cimarrones mediante la metodología de PCR. En el 70% de los marcadores se logró amplificación de loci. Los RAPD 401 y 403 mostraron un mayor número de loci polimórfico (58.33%), con un índice de similitud del patrón de bandas de  $S=0.79$  y  $0.86$  respectivamente. Los valores obtenidos nos estarían indicando una homogeneidad genómica en la muestra analizada. La utilización de esta serie de RAPD en una muestra mayor de perros cimarrones así como en otras razas nos permitirán realizar estudios comparativos de variabilidad poblacional.

**Palabras Claves:** Caninos, marcadores moleculares ADN, RAPD.

## SUMMARY

The Cimarrón dog is the only canine breed native in Uruguay. In a conservation program of this breed is important to use molecular DNA markers named RAPD to know the genetic variability. The objective of this work is to evaluate a series of 10 RAPD markers in DNA samples of Cimarron dogs with the PCR methodology. There were loci amplification in 70 % of the markers. RAPD 401 and 403 had a higher number of polymorphic loci (58,33 %), with a band sharing frequency of  $S=0.79$  and  $0.86$  respectively. This numbers would indicate us a genomic homogeneity in the analyzed sample. The use of this RAPD series in a higher cimarron dog sample like in other breeds will let us to do comparative studies of variability in populations.

**Keywords:** Canine, DNA molecular markers, RAPD.

## INTRODUCCIÓN

El Cimarrón es la única raza canina nativa del Uruguay encontrándose estrechamente ligada a nuestro patrimonio histórico cultural (figura 1). Al ser el único recurso genético canino local, es de importancia establecer un programa de Preservación de dicha raza (1).

Si bien se desconoce el origen de esta raza autóctona se estima que se originó a partir de cruzamientos de perros mastines y lebreles introducidos por los españoles durante la conquista de América (2).

En el año 1988 se fundó la Sociedad de Criadores de perros Cimarrones con el objetivo de preservar y rescatar las características de esta raza.

Una de las principales preocupaciones de dicha Sociedad es el desconocimiento de la consanguinidad media de la población y por ende aumentar los riesgos de apareamientos endogámicos debido al bajo número de machos utilizados como reproductores (2).

Dentro de un Programa de Preservación de razas debemos tener en cuenta la utilización de marcadores moleculares de ADN que permiten conocer la variabilidad genética poblacional. Un tipo de marcadores polimórficos denominados RAPD (Random Amplification of Poly-

morphic DNA) han sido ampliamente utilizados para conocer y detectar la va-



Figura 1. Aspecto fenotípico de ejemplares macho y hembra de la raza Cimarrón del Uruguay.

<sup>1</sup> Área Genética, Facultad de Veterinaria, Montevideo-Uruguay. Lasplacas 1550. E. mail: sllambi@adinet.com.uy.

<sup>2</sup> Área Mejora Genética, Facultad de Veterinaria, Montevideo-Uruguay.

<sup>3</sup> Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Facultad de Veterinaria, Zaragoza -España.

riabilidad genética en diversas especies de mamíferos (3). Los RAPD son marcadores con un modo de herencia dominante permitiendo realizar estudios intra e inter- raciales.

Estos marcadores se basan en la amplificación de ADN genómico mediante la PCR utilizando cebadores oligonucleótidos de pequeño tamaño (10 mer) de secuencia aleatoria. La reacción de PCR se realiza en condiciones poco restrictivas en la etapa de hibridización de los cebadores por lo cual todas aquellas regiones donde se produzca la unión de éstos, (en lugares suficientemente próximos y situados en las cadenas opuestas del ADN), resultarán amplificadas (loci) (4). Como resultado de las amplificaciones se obtiene un patrón de bandas o fragmentos de distinto peso molecular (pares de bases, pb) característicos del cebador y del ADN blanco. Las diferencias en el patrón de bandas (polimorfismo) se producen por diferencias entre individuos debido a mutaciones en la secuencias de unión de los cebadores (4, 5).

En el presente trabajo se evalúan una serie de marcadores RAPD para detectar polimorfismo genético en una muestra poblacional de caninos de la raza cimarrón utilizando mezclas de ADN así como muestras individuales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de las muestras de ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de sangre entera de 16 ejemplares hembras (H) y 17 ejemplares machos (M) de la raza canina cimarrón procedentes de distintos criaderos del País. Para la obtención de ADN se utilizó la técnica convencional de extracción con solventes orgánicos (Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico) y precipitación con etanol. La concentración de ADN se ajustó a 20 ug/ml por el método cuali-cuantitativo con muestras de ADN de concentración conocida (6).

Se realizaron mezclas de ADN de la raza: a: mezcla de cantidades iguales de ADN provenientes de muestras de 10 animales (5 H y 5 M), b: mezcla de cantidades iguales de ADN de 5 H y c: mezcla de cantidades iguales de 5 M.

### Amplificaciones de los RAPD

Se estandarizaron las reacciones de PCR para RAPD de la serie N° 5UBC (University of British Columbia), utilizándose 10 cebadores de esta serie (401, 402, 403, 404, 419, 425, 432, 433, 434, 436).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ l conteniendo 10xPCR buffer (200mM, Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mM de cada dNTP, 0.2 mM de cebador y 0.75 U de Taq polimerasa. El programa de PCR consistió en una desnaturalización del ADN a 94°C-2 min (1 ciclo) seguido de 35 ciclos de 94°C-2 min/ 36°C-1 min/72°C-1 min y una extensión final de 5 min a 72°C (7).

### Análisis estadístico

Para los RAPD 401 (figura 2) y 403 se estudio el índice de similitud del patrón de bandas (Band sharing frequency) utilizando la fórmula

$$S = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$$

donde:

N<sub>ab</sub> corresponde al número de bandas comunes a los individuos a y b.

N<sub>a</sub> corresponde al número de bandas en el individuo a.

N<sub>b</sub> corresponde al número de bandas en el individuo b.

El valor promedio del índice de similitud se cálculo mediante la fórmula

$$S = \sum S_i / n,$$

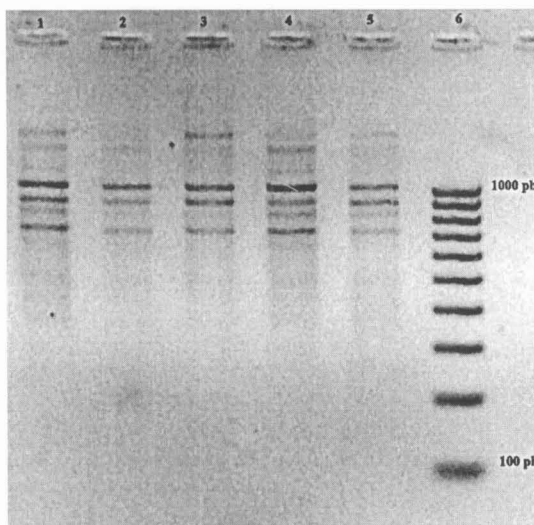
Siendo n el número de comparaciones efectuadas y S<sub>i</sub> el valor del índice para el par analizado (4, 8). Para el cálculo del número promedio de alelos observados, y cálculo de polimorfismo de loci se utilizó el software Freeware Popgene32 version 1.31.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el 70% de los marcadores analizados se logró amplificación de loci en el genoma de perros cimarrones. Los marcadores RAPD 401 y 403 mostraron mayor variabilidad de bandas observadas (7 y 5 bandas respectivamente) con tamaños variables de pares de base (pb), el RAPD 432 mostró 3 bandas de amplificación, los RAPD 419 y 433 mostraron 2 bandas de amplificación. En los RAPD 425 y 434 se observó homogeneidad con una sola banda de amplificación mientras que

en el 30% de los RAPD no se observó amplificación (402, 404 y 436) (cuadro 1). El análisis promedio del índice de similitud del patrón de bandas realizado con los RAPD de mayor variabilidad reveló un S=0.79 para el 401 y un S=0.86 para el 403. Los valores obtenidos para estos dos marcadores nos estarían indicando una homogeneidad en la muestra de animales analizada.

En razas caninas autóctonas de España la utilización de marcadores RAPD mostraron su utilidad para encontrar diferencias entre individuos y diferencias entre razas. A pesar de estos hallazgos los autores demuestran que la variabilidad genética detectada por los RAPD en las razas estudiadas es menor que la detectada cuando se utilizan marcadores microsatélites (4). Por otro lado la utilización de marcadores RAPD, provee de



**Figura 2.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, donde se observa amplificaciones para el marcador RAPD 401. 1 y 2: amplificaciones en muestras de ADN de hembras cimarrones, 3 y 4: amplificaciones en muestras de ADN de machos cimarrones, 5: amplificaciones en mezcla (a) de ADN de perros cimarrones, 6: marcador de peso molecular 100-1000 pb.

**Cuadro 1.** Secuencia, número y tamaño en pares de bases de los loci amplificados con la serie RAPD 5UBC.

RAPD	Secuencia (5'-3')	Amplificación	Nº Bandas	Rango de tamaño (Pb)
401	TAGGACAGTC	+	7	743-1466
402	CCCGCCGTTG	-	-	-
403	GGAAGGCTGT	+	5	748-1171
404	TCTCTACGAC	-	-	-
419	TACGTGCCCCG	+	2	710-1089
425	CGTCGGGCCT	+	1	700
432	AGCGTCGACT	+	3	460-2300
433	TCACGTGCCT	+	2	340-890
434	TCGCTAGTCC	+	1	830
436	GAGGGGGCCA	-	-	-

una herramienta poderosa para analizar regiones del genoma canino que se encuentran pobremente analizadas mediante el mapeo de ligamiento con microsatélites (3). En nuestro trabajo los RAPD 401 y 403 mostraron un mayor número de loci de amplificación en el genoma de esta raza. El análisis del número de loci polimórficos utilizando los RAPD 401 y 403 fue de 7 (58.33%) con un número de alelos promedio de 1.58. Debemos tener en cuenta que el uso de la técnica con RAPD es menos costosa y laboriosa

que la técnica con marcadores microsatélites permitiendo analizar mayor número de muestras de ADN.

#### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten confirmar la utilidad de la serie de marcadores RAPD, 5UBC para la realización de estudios de variabilidad genética en la raza Cimarrón del Uruguay, debiéndose probar en otras razas para así poder realizar estudios comparativos..

#### Agradecimientos

Al Dr. Gonzalo Rincón por su asesoramiento en la utilización de estos marcadores moleculares. A la Dra. Rosa Gagliardi por su asistencia en el inglés técnico. Al Dr. Speranza y su hija, Dra en Veterinaria Rosina Speranza por permitirnos fotografiar ejemplares de la raza cimarrón de su propiedad. A la Sra Iris Hernández, por su asistencia en la preparación de materiales de laboratorio.

#### Referencias bibliográficas

1. Silveira, C.; Mernies, B.; Fernández, G. Barba, C. (1998). Estudio biométrico de una población canina de la raza Cimarrón. Arch. Zootec. 47:529-532.
2. Silveira, C.; Fernández, G. Barba, C. (1998). El perro Cimarrón, la raza canina autóctona del Uruguay. Arch. Zootec. 47:533-536.
3. Olivier, M.; Meehl, M.; Lust, G. (1999). random amplified polymorphic DNA (RAPD) sequences as markers for canine genetic studies. Journal of heredity. 90: 78-82.
4. Morera, L.; Barba, C.; Garrido, J. (2001). Detección de variabilidad en razas caninas autóctonas españolas mediante marcadores RAPD. Arch. Zootec. 50: 379-382.
5. Rothuizen, J.; van Wolferen, M. (1993). Randomly amplified DNA polymorphism in dogs are reproducible and display Mendelian inheritance. Animal Genetics. 25: 13-18.
6. Cheung, W.; Hubert, N.; Landry, B. (1993). A simple and rapid DNA microextracción method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. PCR methods and Applications. 3:69-70.
7. Rincón, G.; Dangelo, M.; Gagliardi, R.; Kelly, L.; Llambí, S.; Postiglioni, A. (2000). Genomic polymorphism in Uruguayan Cróele cattle using RAPD and microsatellite markers. Res. Vet. Sci. 69:171-174.
8. Linch, M. (1990). The similarity index and DNA fingerprinting. Molecular Biology and Evolution. 7:478-484.

