

MÉTODO DE TIPIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE MUESTRAS DE ORINA: SU UTILIDAD EN LA RESOLUCIÓN DE CASOS DE DOPING POSITIVOS EN EQUINOS

EE Villegas-Castagnasso, V It, S Díaz, JP Lirón, A Rogberg, ME Kienast, MV Ripoli, CR Madera, P Peral-García, G Giovambattista

Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA),
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: *El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método de extracción de DNA a partir de muestras de orina de caballos, que permita verificar la correspondencia entre la muestra de orina y el animal problema en casos de doping positivos. De esta forma se podrá determinar: (i) la especie de origen de la muestra y (ii) su identidad. Para tal fin, se obtuvieron muestras de orina (evidencia: muestra primaria y muestra testigo) y sangre (referencia) de caballos de carrera del hipódromo de La Plata y del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional de La Plata). A partir del DNA total se tipificaron cinco microsatélites y el gen mitocondrial citocromo-b mediante los métodos de PCR-geles de secuenciación y PCR-RFLP, respectivamente. Los resultados obtenidos evidenciaron que la técnica desarrollada permitió obtener DNA pericial de todas las muestras. El análisis de los patrones de restricción del gen mitocondrial citocromo-b se correspondió con los patrones esperados para Equus caballus. Además, la comparación de los genotipos obtenidos en la tipificación de los microsatélites, permitió asignar cada muestra de orina a su correspondiente muestra de sangre. Por lo tanto, esta técnica permitiría determinar la especie de origen de la muestra y su identidad, siendo de utilidad para resolver las dudas sobre el origen de las muestras en casos de doping positivos en caballos de carrera.*

PALABRAS CLAVES: Identificación, DNA, Orina, Equinos, Doping.

DNA TYPING METHOD FROM URINE SAMPLES: ITS APPLICATION IN EQUINE POSITIVE DOPING CASES

ABSTRACT: *This study was undertaken to develop a DNA isolation method from equine urine samples in order to determine in doping positive cases: (i) the species determination and (ii) the individual identification of the sample. To do this we used urine (evidence: proof and second proof) and blood (reference) samples from horses taken from La Plata hippodrome and the Hospital School of the Veterinary Sciences Faculty (UNLP). Five microsatellites and the mitochondrial b-cytochrome gene were typed using the PCR-STR and PCR-RFLP methods respectively. The results confirmed that the DNA purified by this method satisfied the need for PCR analysis. The mitochondrial cytochrome-b gene PCR-RFLP patterns matched those Equus caballus. Furthermore, comparison between the microsatellite genotypes permitted to assign each urine sample with its corresponding blood sample. In conclusion, the proposed method allowed the species determination and the individual identification of the sample in positive doping cases in racing horses.*

KEY WORDS: Identification, DNA, Urine, Equine, Doping.

Fecha de recepción: 18/06/03

Fecha de aprobación: 02/10/03

Dirección para correspondencia: G.Giovambattista, CIGEBA, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: ggiovam@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

En los eventos deportivos que se llevan a cabo en los principales hipódromos de la Argentina, se realizan oficialmente controles antidoping a los caballos de Pura Sangre de Carrera que obtuvieron el primer y segundo puesto. Las muestras de orina de estos animales son enviadas al laboratorio donde se realiza el análisis. En los casos de doping positivo, los propietarios tienen la posibilidad de apelación si presentan dudas sobre el origen de la muestra de orina.

Trabajos previos llevados a cabo en muestras humanas demostraron la utilidad del método para obtener DNA pericial a partir de muestras de orina (1, 2, 3). Actualmente en la Argentina, no se dispone de un método de verificación de la correspondencia entre la muestra de orina y el animal problema. El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar un método de extracción de DNA a partir de muestras de orina de caballos. Con esta metodología será posible obtener DNA pericial de sangre y orina, permitiendo resolver, en casos de doping positivos: (i) la especie de origen de la muestra y (ii) su identidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras analizadas y extracción de DNA:

Se obtuvieron muestras de 10 ml de orina (prueba y contraprueba) de 11 Caballos de Pura Sangre de Carrera del hipódromo de La Plata y del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). El método de extracción de DNA a partir de las muestras de orina consistió en concentrar por centrifugación las células epiteliales de descamación y lavarlas tres veces con agua bidestilada. Posteriormente, el *pellet* se incubó en 300 µl de buffer de extracción (50 mM de HCl-Tris, 25 mM de DTT, 2 % de N-Laurylsarcosine) y 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml) a 55 °C durante 3 h. El DNA total se purificó mediante dos técnicas, primero con un volumen de cloroformo y a continuación con acetato de amonio 10 M. Finalmente, el DNA se precipitó con un volumen de isopropanol, se resuspendió en agua bidestilada y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Simultáneamente, se recolectaron muestras de sangre (referencia) de los mismos animales utilizando las tarjetas ISOCODE (Schleicher y Schuell, Keene, NH, USA). En este caso, el DNA se purificó siguiendo las recomendaciones de los proveedores (<http://www.s-und-s.de>).

Tipificación:

A partir del DNA genómico se tipificaron los microsatélites LEX52 (4), LEX34 (4), ASB2 (5), HMS3, HMS6 y HMS7 (6) mediante la técnica de PCR-geles de secuenciación. Para la identificación individual los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes al 5 % (19:1) 1X TBE y se revelaron con nitrato de plata 0,1 % (p/v).

Con el fin de realizar la asignación de la especie de origen se tipificó el gen mitocondrial citocromo-b, mediante el método de PCR-RFLP (6). Los amplificados se digirieron con las enzimas de restricción *AluI*, *HaeIII* y *HinfI* y los productos se discriminaron en minigeles nativos al 8 % (19:1) 1X TBE, siendo revelados con nitrato de plata 0,1 % (p/v). Como marcador de peso molecular se utilizó el plásmido pBR322 digerido con *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA).

RESULTADOS

Los resultados evidenciaron que la técnica utilizada permitió obtener DNA pericial de todas las muestras de orina analizadas. Por lo que se pudo tipificar los seis marcadores genéticos utilizados (seis microsatélites y citocromo b).

El análisis de los patrones de restricción del gen mitocondrial citocromo b se utilizó para determinar la especie de origen de las muestras de orina tipificadas. En el 100% de los casos, los patrones de restricción correspondieron al esperado para la especie *Equus caballus* (Figura 1).

Se realizó la comparación de los genotipos obtenidos de la tipificación de las muestras de orina. Los resultados permitieron asignar cada muestra de orina a su correspondiente muestra de sangre y, por lo tanto, determinar la identidad de las muestras problema incluidas en el presente trabajo (Figura 2).

DISCUSIÓN

La técnica desarrollada permitiría determinar la especie de origen de la muestra y su identidad en casos de doping positivos de caballos de carrera u otras razas equinas que sean sometidos a este tipo de controles. De esta forma, la presente técnica sería de utilidad por su repetitividad y por permitir resolver las dudas sobre el origen de las muestras planteadas por los propietarios en las apelaciones durante casos de doping positivos en caballos de carrera.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado con fondos del servicio de Diagnóstico Genético en Animales Domésticos de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Los autores quieren agradecer a la Med. Vet. Gabriela Chavez y al Dr. Martín Abba por sus desinteresados aportes y al Centro de Investigaciones y Diagnóstico de Doping (Instituto Provincial de Lotería y Casinos de la provincia de Buenos Aires) y a los Med. Vet. Gabriela Balescies y Marcos Muriel del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) por el suministro de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brinkmann B, Rand S, Bajanowski T. Forensic identification of urine samples. *Int J Legal Med* 1992; 105(1): 59-61.
2. Schmitt C, Benecke M. Five cases of forensic short tandem repeat DNA typing. *Electrophoresis* 1997; 18(5): 690-694.
3. Junge A, Steevens M, Madea B. Successful DNA typing of a urine sample in a doping control case using human mitochondrial DNA analysis. *J Forensic Sci* 2002; 47(5): 1022-1024.
4. Coogle L, Reid R, Bailey E. Equine dinucleotide repeat loci LEX034-LEX048. *Animal Genetics* 1997; 28: 309.
5. Breen M, Lindgren G, Binns M. Genetical and physical assignments of equine microsatellites-first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mammalian Genome* 1997; 8: 267-273.
6. Guérin G, Bertaud M, Amigues Y. Characterization

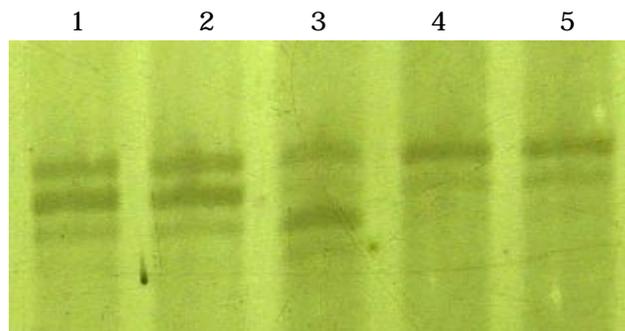


Figura 2. Productos de amplificación del microsatélite LEX52 sometidos a electroforesis en geles desnaturizantes al 5% (19:1) 1X TBE. Los geles se revelaron con nitrato de plata 0,1% . Calle 1: Caballo 1 orina; calle 2: caballo 1 sangre; calle 3: animal no relacionado; calle 4: caballo 2 orina; calle 5: caballo 2 sangre.

Figure 2. PCR products of Microsatellite LEX52 running in a 5% (19:1) 1X TBE denatured electrophoresis gel, and staining with silver nitrate (0,1% p/v). Lane 1: horse 1 urine; lane 2: horse 1 blood; lane 3: unrelated horse; Lane 4: horse 2 urine; lane 5: horse 2 blood.

of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. *Animal Genetics* 1994; 25: 62.

7. Bravi C, Lirón JP, Mirol PM, Ripoli V, Peral-García P, Giovambattista G. A brief method for species identification from forensic material using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. *Revista de la Sociedad Argentina de Genética, XXXII Congreso Argentino de Genética, XXXVI Congreso Chileno de Genética, IV Jornadas Argentino-Chilenas de Genética. 2003; XV, Supl. 2: 48*

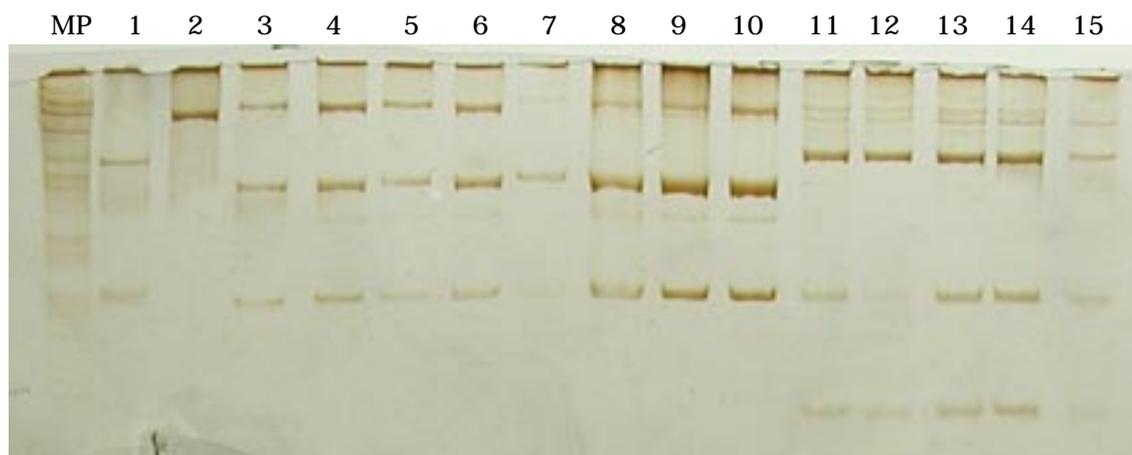


Figura 1. Productos de amplificación del gen mitocondrial citocromo b digeridos con la enzima de restricción *HinfI* discriminados en minigeles nativos al 8 % (19:1) 1X TBE. Los geles se revelaron con nitrato de plata 0,1 % (p/v). Mp: Marcador de Peso Molecular (pBR322 digerido con *MspI*), Calle 1: cordero; Calle 2: conejo; Calle 3-10: bovinos; 11-15: equinos.

Figure 1. PCR-RFLP patterns for cytochrome b (cyt b) obtained by digestion with *HinfI*, running in 8 % (19:1) 1X TBE. mini-gel, and staining with silver nitrate (0,1 % p/v). MP: Molecular marker (*MspI* digest of pBR322), Lane 1: rabbit; lane 2: sheep; lane 3-10: bovines; lane 11-15: equine.