

DETERMINACION DEL SEXO EN LA ESPECIE CANINA MEDIANTE LOS LOCI ZFX/ZFY

Aznar, M.P.; García-Muro, E.; Osta, R. y Zaragoza, P.

Laboratorios de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos. Facultad de Veterinaria. C/ Miguel Sevet, 177. 50013 Zaragoza.

Introducción

Los loci ZFX/ZFY se encuentran localizados en los cromosomas X e Y respectivamente (Leung y cols, 1990). Son secuencias altamente conservadas y las poseen todos los mamíferos hasta ahora estudiados, entre ellos, las especies humana, bovina, ovina, porcina, equina (Aasen y Medrano, 1990). Unas de las aplicaciones más importantes del uso de estas secuencias en la biotecnología genética son el sexaje de embriones en ganado vacuno (Pollevick y cols., 1992), el diagnóstico de Freemartinismo (Osta, 1994), el sexaje de especies incluídas en programas de conservación (Villalta y cols, 1996) o en las que es difícil diferenciar el sexo en los exámenes clínicos (Schwerin y Pitra, 1994). Todas ellas utilizan la PCR o reacción en cadena de la polimerasa con el posterior estudio de los RFLPs como método de diagnóstico del sexo. Hasta el momento no había sido descrita la amplificación por PCR de fragmentos de los loci ZFX/ZFY en la especie canina. El objetivo de este trabajo fue el estudiar esta región en la especie canina, a la vez de encontrar sitios de restricción para el estudio de RFLPs específicos del sexo, que puedan utilizarse en problemas relacionados con estos cromosomas.

Material y Métodos

Para realizar el presente estudio, se escogieron al azar 20 muestras de sangre de perro (10 machos y 10 hembras). La extracción de ADN se realizó con un protocolo basado en lavados para eliminar los glóbulos rojos y posterior lisis de los glóbulos blancos con una solución de proteinasa K (Osta, 1994). Para la amplificación mediante la PCR se escogieron los cebadores descritos por Aasen y Medrano (1990), ya que con ellos se habían conseguido fragmentos de aproximadamente 445 pb en diferentes especies.

Cada reacción de amplificación tuvo un volumen final de 50 µl que contienen: 50 ng de ADN; 75 pmol de cada cebador; 1,25 U de Taq Polimerasa; 50 mM KCl; 10mM Tris-HCl (pH=9); 0,01% gelatina; 0,1 triton x-100; 1,5 mM MgCl₂, dNTPs (200 mM).

Asimismo se siguió el siguiente ciclo de temperaturas en el termociclador: un ciclo de 94°C durante 2 min., 60°C durante 45 seg. y 73°C durante 1 min., 29 ciclos de 94°C durante 45 seg., 60°C durante 45 seg. y 73°C durante 1 min.

La visualización del fragmento amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y bajo luz ultravioleta.

Una vez comprobada la amplificación se realizó la digestión con un panel de enzimas de restricción: Pst I, Hae III y Taq I.

La visualización de los posibles polimorfismos (RFLPs) se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 4% (2% Nuesieve/2% normal) teñido con bromuro de etidio y bajo luz ultravioleta.

Resultados y Discusión

Con la metodología descrita se obtuvo un fragmento de aproximadamente 445 pb, similar a la descrita por Aasen y Medrano (1990) en otras especies, incluida la humana. Después de realizar la digestión con el panel de enzimas anteriormente mencionado se comprobó que la enzima Pst I no reconocía ningún sitio de restricción, al contrario de lo descrito en vacuno. Sin embargo, las enzimas Hae III y Taq I reconocen un sitio de restricción. En el caso del análisis con Taq I, esta enzima reconoce el fragmento ZFY, mientras que el fragmento ZFX permanece sin cortar. Por el contrario la endonucleasa Hae III corta el fragmento ZFX y no digiere el ZFY. En ambos casos se producen dos bandas visibles de aproximadamente 445 y 344 pb exclusivamente en las muestras que proceden de machos.

Este diagnóstico puede ser utilizado en todos aquellos casos en los que existe relación con alteraciones en cromosomas sexuales, además de lógicamente ser un método eficiente para el diagnóstico del sexo en embriones.

Así por ejemplo una aplicación eminentemente práctica de esta metodología sería el diagnóstico del "sexo reverso" descrito en la especie canina (Nicholas, 1996). Ocasionalmente hay individuos que han mostrado un fenotipo masculino y su dotación cromosómica es XX e individuos que muestran un fenotipo femenino pero que su dotación cromosómica es XY (Nicholas, 1996). En este caso el método descrito mostraría como a un fenotipo, por ejemplo masculino, le acompaña un modelo de RFLPs femenino (una banda de 445 pb exclusivamente).

Bibliografía

1. Aasen, E. & Medrano, J.F. (1990) *Biotechnology* **8**, 1279-1281
2. Leung et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* **54**, 151-153
3. Osta, R. (1994). *Tesis Doctoral*. Universidad de Zaragoza.

4. Nicholas, F.W. (1996). Introduction to Veterinary Genetics. Ed. Oxford
4. Pollevick, G.D. y cols. (1992). *Bio/Technology*, **10**:805
5. Schwerin, M. Y Pitra, C. (1994). *Theriogenology*, **41**: 553
6. Villalta, M. y cols. (1996). *ITEA*, **92A**: 93