UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD MEDICINA VETERINARIA
E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA.

Determinación de parentesco por medio del análisis de ADN microsatélite en alpacas(lama pacos)

TESIS Para optar el título profesional de MEDICO VETERINARIO

AUTOR
Rodríguez Bailon Jorge Enrique

LIMA – PERÚ 2004

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Virología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM y en la Unidad de Biodiversidad y Procesos Ecológicos de la Universidad de Cardiff, fue financiado por la Coordinadora de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos (CONOPA).

A Dios, a mis padres Gerardo y Filomena por inculcarme valores; a mis hermanos Lilian, Carlos y a mi sobrino Gianluca por darme un motivo más para superarme y a mi inseparable compañera Maria por su apoyo constante, cariño y comprensión durante todo este tiempo.

Agradecimientos:

A la Dra. Jane C. Wheeler y Dr. Raul Rosadio por el apoyo constante y sus consejos para la elaboración del presente trabajo.

A Eugenio Artaza Llona por su amistad, sincero apoyo y por muchas cosas más.

Al Dr. Michael W. Bruford y Dra. Ciara Dodd por enseñarme además de ciencia, el valor de la amistad.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Katy, Rocio, Conrad y Willy por las múltiples sugerencias.

A Josmel por su apoyo, múltiples consejos, por su sincera y gran amistad, la cual valoro y admiro.

A todos mis compañeros en Cardiff por hacerme sentir como en casa.

Un agradecimiento especial a tres instituciones que financiaron y apoyaron en el presente trabajo.

DARWIN INITIATIVE

CARDIFF UNIVERSITY
PRIFYSGOL CAERDYDD

CONOPA

ÍNDICE

Índice	i
Resumen	ii
Sumary	iii
Abreviaturas	iv
Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
I.- Introducción	1
II.- Revisión de Literatura	2
1. Microsatélites	2
2. Minisatélites	7
3. Polimorfismo de simple nucleótido (SNP)	7
4. Marcadores genéticos	8
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	11
6. Electroforesis de ADN	16
7. Determinación de parentesco	25
8. Técnicas de determinación de parentesco	30
III.- Materiales y Métodos	39
1. Materiales	39
2. Metodología	41
IV.- Resultados	50
V.- Discusión	63
VI.- Conclusiones	66
VII.- Literatura citada	67

RESUMEN

Diez microsatélites para alpacas y llamas fueron usados para evaluar parentesco en 47 alpacas registradas de la Estación Experimental IVITA - Maranganí, provenientes de la provincia de Canchis (Cusco - Perú). El análisis se llevo a cabo utilizando dos metodologías: secuenciador automático (ABI 377 DNA sequencers?) y técnica de tinción con nitrato de plata. Los microsatélites fueron amplificados en tres reacciones de PCR múltiple y diez reacciones de PCR simple. Los 10 microsatélites fueron polimórficos para ambas metodologías. El número de alelos vario entre 4 y 20, las frecuencias alélicas y probabilidad de exclusión (PE) fueron calculadas utilizando el software Cervus 2.0. Todos los loci, a excepción de dos, se encontraron dentro de los rangos publicados por Lang *et al.* (1996) y Penedo *et al.* (1998). La probabilidad de exclusión acumulada para los 10 loci de 0.9999. La probabilidad de exclusión acumulada para cada reacción de PCR múltiple fue mayor a 0.90. Ambas metodologías obtuvieron los mismos resultados. Los resultados confirmaron la paternidad en 17 casos, sin embargo, en más de un 22% de los casos, padres alternativos fueron identificados como padres comparando con los registros.

Palabras clave: Alpaca, paternidad, microsatélites, tinción con nitrato de plata.

SUMARY

Ten microsatellites for alpacas and llamas were used to evaluate paternity in 47 alpacas registered at IVITA Research Station Maranganí, Canchis Province (Cusco – Perú). Analysis was carried out using both methodologies: Automatic Sequencer (ABI 377 DNA sequencers?) and silver staining techniques. Microsatellites were amplified in three multiplex reactions and ten single PCR reactions. They were polymorphic for all alpaca samples using both methodologies. The number of alleles varied between 4 and 20, the allelic frequencies and the exclusion probability were calculated using Cervus 2.0. All loci, except for two, were within the range published by Lang *et al.* (1996) and Penedo *et al.* (1998). The accumulated exclusion probability for the ten loci was 0.9999. For each multiplex reaction the accumulated exclusion probability was more than 0.90. Both methodologies yielded the same results. It was possible obtain the same results using both methodologies. The results confirmed paternity in 17 cases of parent-offspring pairs, however in a further 22% of cases alternative adults were identified as parents compared with the register.

Key words: Alpaca, paternity, microsatellites, silver staining.

I.- INTRODUCCIÓN

Actualmente los camélidos sudamericanos representan un recurso pecuario que cada vez se está explotando en mayor amplitud tanto para producción de fibra, de carne y también como mascotas. Estudios recientes han demostrado la existencia de ciertos sistemas de marcadores genéticos que permiten identificar hibridismo en estas especies (Kadwell *et al.*, 2001). La utilidad de estos marcadores genéticos para identificar camélidos híbridos serviría como punto de partida para crear núcleos de reproductores, siendo el paso primario en el establecimiento de un programa de mejoramiento genético, por lo cual se torna necesario contar con un registro y libro genealógico para dichos animales y para su descendencia. En varios países como EE. UU, Canadá, Reino Unido y Australia el ingreso de camélidos a libros de registro, tanto de nuevos animales como de su descendencia, se basan en pruebas genéticas (ADN microsatélite) que son 100 % seguras para identificación individual y de parentesco. En el Perú a diferencia de estos países, el ingreso a libros de registro de la descendencia de los animales inscritos es en base a pruebas con un grado de certeza relativamente bajo, muy inferior a las obtenidas por pruebas genéticas aceptadas en casi todos los registros genealógicos en el mundo. Por lo tanto es necesario contar con una prueba genética que permita obtener un elevado grado de certeza, de tenga un costo aceptable y que sea aplicable a la tecnología disponible en nuestro país.

II.- REVISIÓN DE LITERATURA

1. MICROSATÉLITES

1.1 Concepto

Los microsatélites, también llamados "Simples secuencias repetidas" (SSRs), "Polimorfismos de longitud de simples secuencias (SSLPs), "Repeticiones cortas en serie" (STRs), "Secuencias simples repetidas" (SSMs), "Secuencias blanco microsatélite" (STMs), son repeticiones en serie de secuencias cortas (no mayores de 6 pares de bases de largo) que se presentan en forma aleatoria en el genoma eucariota (Aranguren-Mendez & Jordana, 2001; Areshchenkova, 2000; Binns *et al.*, 2000; Cenis, 2000; Hancock, 1991; Mommens *et al.*, 1998; Schlötterer & Harr, 2001; Thomson & Esposito, 1999) (Figura 1a y 1b).

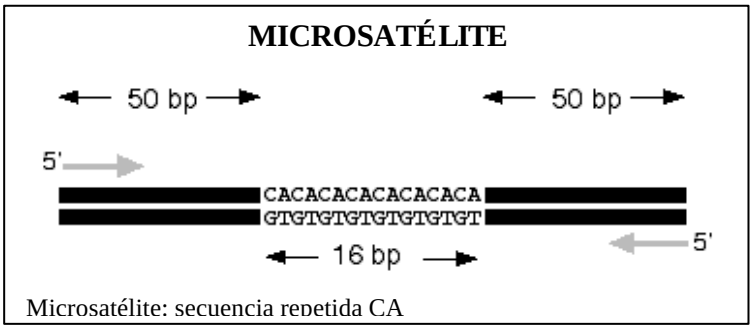


Figura 1 a. Representación esquemática de una secuencia microsatélite

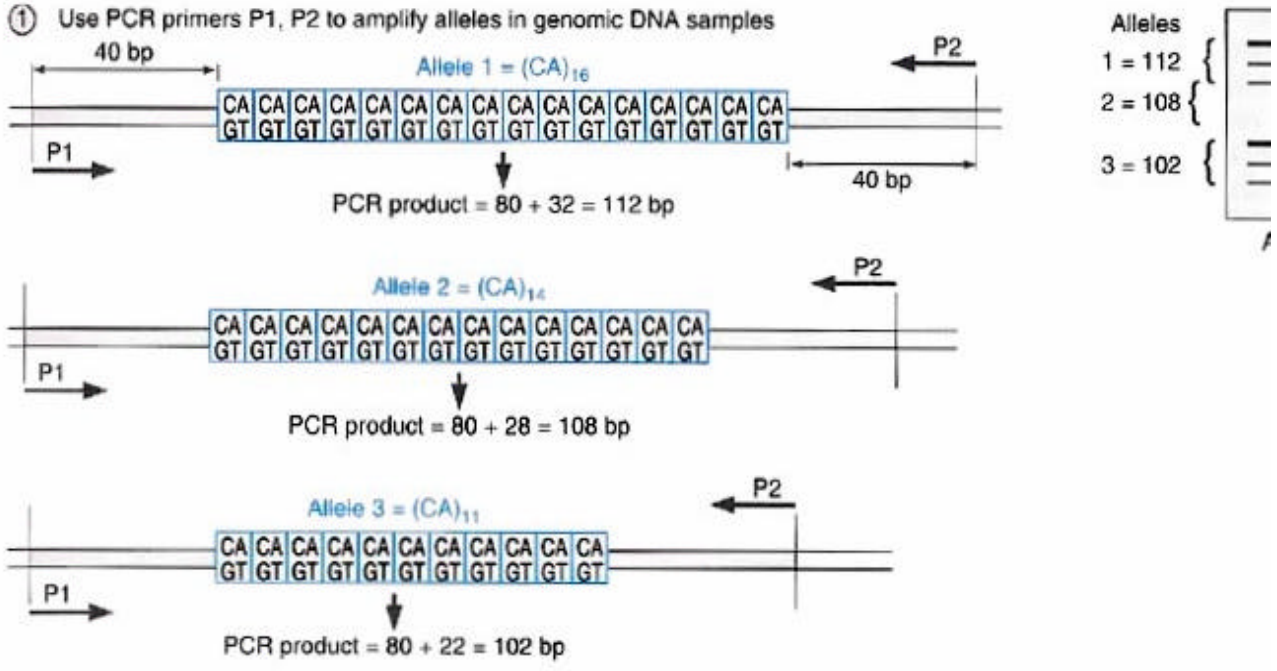


Figura 1 b. Presencia de polimorfismo en dos secuencias microsatélite.

1.2 Características

Los microsatélites presentan múltiples características, entre las más importantes podemos citar:

a. Son muy frecuentes y están repartidos en todo el genoma eucariota (Aranguren-Mendez & Jordana, 2001; Becerra & Paredes, 2000; Cenis, 2000; Hayden & Sharp, 2001; Morera *et al.*, 1999; Vega-Pla *et al.*, 1998).
b. Son multialélicos y presentan alto grado de polimorfismo (Aranguren-Mendez & Jordana, 2001; Areshchenkova, 2000; Becerra & Paredes, 2000; Cenis, 2000; Hayden & Sharp, 2001; Morera *et al.*, 1999; Sirchia *et al.*, 1996; Vega-Pla *et al.*, 1998).
c. Su modelo de herencia es mendeliano y los alelos detectados presentan codominancia (Aranguren-Mendez & Jordana, 2001; Sirchia *et al.*, 1996; Vega-Pla *et al.*, 1998).
d. Requieren de mínimas cantidades de material biológico para su análisis, permitiendo incluso el análisis de muestras degradadas (Becerra & Paredes, 2000; Vega-Pla *et al.*, 1998).
e. Son fáciles de medir y analizar, siendo 100% fiables, repetitivos y automatizables (Aranguren-Mendez & Jordana, 2001) (Figura 2).



② Denature PCR products and size-fractionate by polyacrylamide gel electrophoresis

③ Autoradiography

Debido a estas características, los microsatélites son considerados como los marcadores de elección para identificación individual, uso en pruebas forenses, determinación de parentesco, control de genealogías, reconstrucción filogenética de especies estrechamente relacionadas, caracterización de diversidad genética en razas, mapeo genético en eucariotas (Aranguren-Mendez & Jordana, 2001; Areshchenkova, 2000; Cenis, 2000; Hayden & Sharp, 2001; Morera *et al.*, 1999; Schlötterer & Harr, 2001; Shinde *et al.*, 2003; Sirchia *et al.*, 1996; Vega-Pla *et al.*, 1998).

1.3 Distribución, composición y frecuencia

La distribución de los microsatélites en el genoma eucariota es mas o menos uniforme dentro del genoma eucariota (Hancock, 1991; Schlötterer & Harr, 2001) y esta determinada por el tipo de repetición (mono, di, tri, tetranucleótida) y por la composición de la secuencia repetida (Schlötterer & Harr, 2001), asi como la frecuencia genómica de los microsatélites esta inversamente relacionada con el número de repeticiones (Schlötterer & Harr, 2001).

Las repeticiones dinucleótidas más comunes son las CA/TG y las repeticiones trinucleótidas más comunes son CAG / AAT (Areshchenkova, 2000; Hancock, 1991), asimismo en los mamíferos, la mas abundante repetición dinucleótida es $(GT/CA)_n$ (Areshchenkova, 2000; Binns *et al.*, 2000; Schlötterer & Harr, 2001).

1.4 Mutación

Los rangos de mutación en microsatélites difieren entre especies y dentro de especies, siendo el principal factor determinante la variación en la longitud individual del microsatélite (Ellegren, 2000). Esta bien establecido que un alto número de repeticiones causan un elevado rango de mutaciones, así como, repeticiones di, tri y tetranucleótidas dan diferentes rangos de mutación (Ellegren, 2000; Schlötterer & Harr, 2001), por ejemplo las repeticiones dinucleótidas parecen tener tasas de mutación 1.5 a 2 veces mayores que las tetranucleótidas y las trinucleótidas (Bernoco *et al.*, 1997).

Los mecanismos predominantes de la mutación de los microsatélites son saltos en la cadena molde de ADN y mal pareado de bases (SSM) durante la replicación (Ellegren, 2000, Hancock, 1991; Schlötterer & Harr, 2001; Dawid *et al.*, 2001).

1.5 Inestabilidad de los microsatélites

La inestabilidad de los microsatélites hace que sean muy usados para estudios genéticos y evolutivos. La mayor parte de los cambios en el número de repeticiones en los microsatélites son causados por saltos de la ADN polimerasa en las cadenas molde de ADN y errores en el pareado de las bases durante la replicación (Eisen, 1991). La inestabilidad de los microsatélites puede ser considerada como un balance entre la generación de errores durante la replicación y la corrección de algunos de estos errores por los sistemas de corrección celulares (Eisen, 1991).

1.6 Mecanismos básicos para la inestabilidad de los microsatélites

Se han postulado y estudiado dos modelos de mutación de los microsatélites:

a. Irregular Crossing Over (UCO), este modelo propone que la inestabilidad de los microsatélites es causada por un elevado grado de cruzamiento irregular durante el crossing over, resultado de la recombinación entre cromosomas homólogos que son imperfectamente alineados. Este modelo sugiere además que la presencia de repeticiones en los microsatélites, incrementa la probabilidad de mal alineamiento entre cromosomas homólogos (Ellegren, 2000; Eisen, 1991).
b. Saltos de la ADN polimerasa en la cadena molde de ADN y mal pareado de bases (SSM), este modelo propone que la inestabilidad de los microsatélites es causada por un elevado grado de SSM durante la replicación del ADN (Eisen, 1991; Ellegren, 2000). Los SSM ocurren en un elevado grado en los microsatélites, debido a la presencia de repeticiones, lo cual incrementa la posibilidad de mal alineamiento durante la replicación de la cadena molde de ADN (Eisen, 1991; Ellegren, 2000). Los SSM constan de 3 pasos: saltos de la ADN polimerasa durante la replicación,

un error en el realineamiento del ADN molde nuevamente en las cadenas replicadas y la continuación de la replicación de los moldes mal alineados (Eisen, 1991; Ellegren, 2000).

2. MINISATÉLITES

Los minisatélites también llamados repeticiones en serie de número variable (VNTR), son monómeros de secuencias repetidas que generalmente varían de 9 a 35 pares de bases (Armor *et al.*, 1991; Becerra & Paredes, 2000; Binns *et al.*, 2000), se encuentran presentes en todos los cromosomas y no son transcritas (Binns *et al.*, 2000). El significado de los minisatélites no es muy claro, aunque ellos han sido reportados como puntos de reunión para recombinación homologa (Binns *et al.*, 2000).

El uso de sondas de minisatélites han demostrado ser altamente efectivas en estudios de diversidad genética y identificación individual, con una probabilidad que dos individuos tenga el mismo patrón estimadas en 3.2×10^{-12} (Becerra & Paredes, 2000; Binns *et al.*, 2000; Thomson & Esposito, 1999). Sin embargo tienen una desventaja, son menos frecuentes que los microsatélites y no están distribuidos equitativamente a través del genoma lo cual descarta su uso como tamiz genético (Thomson & Esposito, 1999).

3. POLIMORFISMO DE SIMPLE NUCLEÓTIDO (SNP)

Los polimorfismos de simple nucleótido (SNPs) corresponden a diferencias en una simple posición de un nucleótido (sustitución, deleción o inserción) que ocurren aproximadamente cada 1.3 Kilobases (Kb) (Areshchenkova, 2000), son el tipo más común de variación genética del ADN humano, ocurren en promedio 1 por cada 1000 pares de bases (Thomson & Esposito, 1999). Los SNPs son bialélicos y menos informativos que los microsatélites, debido a esto, de 25 a 50 polimorfismos de SNPs deben ser probados para lograr niveles de probabilidad de exclusión (PE) comparable con aquella mostrada por los

microsatélites (Binns *et al.*, 2000). Además a diferencia de los microsatélites los SNPs son mas frecuentes, mutacionalmente más estables siendo posible su automatización (Areshchenkova, 2000; Thomson & Esposito, 1999),

4. MARCADORES GENÉTICOS

La gran utilidad de las técnicas moleculares es que permiten observar diferencias directamente en el ADN, lo cual permite encontrar diferencias en variedades o individuos fenotípicamente idénticos (Cenis, 2000).

Los marcadores genéticos se basan en polimorfismos de secuencias nucleótidas de regiones genómicas definidas, detectadas por enzimas de restricción o por sitios de alineamiento (Areshchenkova, 2000). Existen muchos tipos de marcadores genéticos (Tabla 1), pero un marcador genético ideal debe reunir una serie de características: buena distribución a lo largo del genoma, alto grado de polimorfismo, herencia estable (baja tasa de mutación), elevada reproductibilidad y precisión, ausencia de alelos nulos, usar pequeñas cantidades de ADN y/o tejidos, incluso parcialmente degradados, barato y eficiente, fácil y rápida transferencia de la información del genotipo y que presenten una segregación independiente respecto a otros marcadores al ser combinados en una prueba (Aranguren-Mendez & Jordana, 2001; Mueller & LaReesa, 1999).

Tabla 1. Características comparativas de 7 marcadores genéticos

CRITERIO	PROTEÍNAS	ISOENZIMA	RFLP	RAPD	VNTR	SSR
Polimorfismo	Alto	Bajo	Bajo-alto	Medio-alto	Medio-alto	Alto
Simple o Multilocus	Unilocus	Unilocus	Unilocus	Multilocus	Multilocus	Unilocus
Codominante (C) o dominante (D)	C	C	C	D	C	C
Número de *loci*	Bajo	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto
Estabilidad ambiental	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta	Alta
Reproducibilidad	Alta	Moderada / Alta	Alta	Moderada / Alta	Alta	Alta
Aplicación	Rápida -barata	Rápida -barata	Lenta- cara	Rápida- cara	Intermedia	Lenta/cara

RFLP Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RAPD Polimorfismo de ADN amplificado al azar
VNTR Número variable de repeticiones en serie (minisatélites)
AFLP Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados
SSR Secuencias simples repetidas (microsatélites)

Fuente: Modificado de Becerra & Paredes (2000), Mueller & LaReesa (1999) y Sunnucks (2000).

Existen muchos métodos para detectar polimorfismos de ADN, generalmente se usan 3 grandes tecnologías:

a. Reacción en cadena de la polimerasa, que permite amplificar una secuencia específica de ADN.
b. Electroforesis en gel, que permite separar moléculas de ADN en base a su longitud o volumen.
c. Hibridización de oligonucleótidos de ADN, en esta técnica los oligonucleótidos son hibridizados al ADN blanco.
d. La visualización del ADN, mediante teñido con nitrato de plata, bromuro de etidio, marcado con componentes radioactivos o fluorescentes (Barendse & Fries, 1999).

Los diferentes métodos de detección de polimorfismos son resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Matriz de combinación de métodos para detección de polimorfismos*.

Tipo	Matriz	DNA oligonucléotidos	Marcado	Variación
RFLP	Ag/PAGE	Clon/Sint/PCR	AR/EB/SS/FL	PM/ID
ACRS	Ag/PAGE	Sint/PCR	AR/EB/SS/FL	PM
VNTR	Ag/PAGE	Clone/Sint/PCR	AR/EB/SS/FL	R/PM
SSCP	PAGE	PCR	AR/SS/FL	PM/ID
HD	Ag/PAGE	PCR	AR/EB/SS/FL	PM/ID
DGGE	PAGE	PCR	AR/SS/FL	PM/ID
STRP	Denat. PAGE	PCR/Sint	FL/AR/SS	R/PM
AFLP	Denat. PAGE/Ag	PCR	FL/AR/SS/EB	PM/ID
RAPD	Denat. PAGE/Ag	PCR	AR/EB/FL	PM/ID
ASO	Ninguna	Sint/PCR	AR/FL	PM
SNP	Ninguna	Sint	FL/AR	PM

* En la columna vertical están los acrónimos de las técnicas y en la columna horizontal están los métodos usados para detectar los polimorfismos.

RFLP Polimorfismos de fragmentos de longitud de fragmentos de restricción
ACRS Amplificación de sitios de restricción creados
VNTR Repeticiones en serie de numero variable (minisatélites)
SSCP Polimorfismo de conformación de simple cadena
HD Heteroduplex
DGGE Electroforesis de gradiente en gel desnaturalizado
STRP Polimorfismo de repeticiones simples en serie (microsatélites)
AFLP Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
RAPD DNA polimorfito amplificado al azar
ASO Oligonucleótido alelo específico
SNP Polimorfismo de simple nucleótido
Ag Agarosa
PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida
Clon Oligonucleótidos derivados de la copia de un clone
Sint Oligonucleótidos sintetizados
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
AR Autoradiografía
EB Bromuro de etidio
SS Tinción de plata
FL Marcado fluorescente
PM Punto de mutación
ID Inserción/delección
R Repetición

Fuente: Barendse & Fries (1999)

5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

5.1 Concepto

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica utilizada para amplificar in vitro secuencias específicas de ácidos nucleicos (Aert *et al.*, 1998; Karcher, 1995). Este proceso de amplificación requiere de cantidades mínimas de ADN (microgramos) que pueden ser obtenidos de una simple molécula (Brown, 2000; Stracham & Read, 1999).

5.2 Metodología

La PCR es una reacción in vitro, que es realizada por la mezcla apropiada de reactivos y su incubación posterior en un termociclador, equipo que permite la incubación a temperaturas que son variada por intervalos de tiempo de una pre programada manera (Brown, 2000).

Los pasos básicos de la PCR son (Figura 3):

a. Desnaturalización: el ADN, es desnaturalizado por calentamiento a 94°C (Brown, 2000).
b. Alineamiento: un par de oligonucleótidos es adicionado al ADN (cebadores) y la mixtura es enfriada entre 50 y 70°C, esto depende de la temperatura de fusión (Tm) de los oligonucleótidos usados, a esta temperatura los oligonucleótidos se adhieren a sus sitios blanco (Brown, 2000; Aert *et al.*, 1998; Stracham & Read, 1999).
c. Extensión (síntesis): una ADN polimerasa termoestable es adicionada, la Taq polimerasa (ADN polimerasa tipo I, enzima de una bacteria termotolerante *Thermus aquaticus*), junto con un suministro de precursores de ADN (deoxinucleósidos trifosfatos: dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la mezcla es calentada a una temperatura óptima para la síntesis de ADN, entre 70 a 75°C (Brown, 2000; Stracham & Read, 1999). Los oligonucleótidos alineados en el ADN molde, actúan ahora como

cebadores o cebadores para la síntesis de nuevos polinucleótidos complementarios para las cadenas molde de ADN (Brown, 2000).

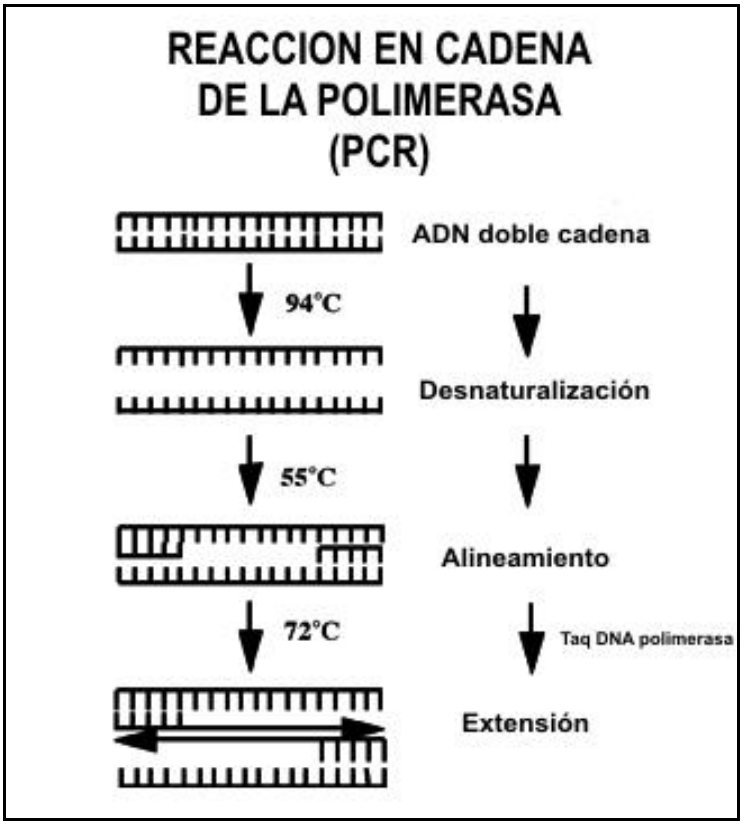


Figura 3. Fases de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión son repetidos de 25 a 30 veces, con un número de moléculas de ADN sintetizado que se dobla durante cada ciclo, esta exponencial amplificación resulta en la síntesis de un gran número de copias de la secuencia de ADN flanqueado por el par de oligonucleótidos (Brown, 2000)

5.3 Optimización de los componentes de la PCR

5.3.1 Designación de cebadores

Los cebadores son el componente clave de la PCR y el acierto o falla de la amplificación depende mucho de su correcta designación (Brown, 2000).

Citamos a continuación algunos puntos a tomar en cuenta en la designación de cebadores:

a. La longitud determina la especificidad del cebador: si un cebador es corto este tiene una gran posibilidad de alinearse en mas de un sitio en el ADN molde (Brown, 2000). La frecuencia aproximada de una particular secuencia esta representada por 4^n, donde n es la longitud de la secuencia del cebador (Brown, 2000). En la practica los cebadores de 15 – 20 nucleótidos son usados para muchos propósitos (Brown, 2000; Stracham & Read, 1999), si los cebadores son mayores a 30 nucleótidos entonces los rangos de hibridización, que incrementan con la longitud, llegaran a ser un factor determinante y el completo alineamiento puede no ocurrir durante el tiempo permitido dentro de los ciclos termales (Brown, 2000).
b. Un cebador no esta disponible para alinearse con su secuencia complementaria por haberse unido con el otro cebador: si el extremo 3- final de un cebador puede alinearse con algún sitio interno en el segundo cebador, entonces la extensión desde el extremo final 3- por la *Taq* polimerasa conduciría a la formación de dímero de cebador. La dimerización es promovida por las altas concentraciones de cebadors durante los ciclos iniciales de la PCR y durante esta etapa puede reducirse la síntesis de productos de amplificación debido a una competencia por la polimerasa (Brown, 2000). La reducción de la concentración de cebador causada por la dimerización puede causar una adicional disminución en la calidad del producto en la PCR (Brown, 2000).

5.3.2 Ciclos de temperatura

La desnaturalización usualmente ocurre a 94°C, a esta temperatura la doble cadena de ADN es rápidamente convertida en su forma de simple cadena (Brown, 2000). Extensas incubaciones a esta temperatura pueden causar daño del ADN, debido a divisiones inducidas por agua a los puentes b-glicosídicos entre las bases purinas y los azucares

(desoxirribosa), conduciendo a la despurinización y luego a la división de la cadena de ADN (Brown, 2000). La temperatura de extensión utilizada es de 72°C, que es ligeramente menor a la temperatura óptima de la *Taq* polimerasa (75°C), a esta temperatura, la enzima polimerizará aproximadamente 6000 nucleótidos de ADN por minuto (Brown, 2000). Una elevada temperatura no es usada, porque ponemos en riesgo que los cebadores se separen del ADN molde antes que hayan sido extendidos (Brown, 2000). La PCR es completada con un largo paso de extensión, con la finalidad de que todos los productos sean completamente extendidos al final de la PCR, debido a que la enzima no puede sintetizar en los rangos esperados si uno u otro de los componentes de la reacción esta limitado (Brown, 2000).

A diferencia de las temperaturas de desnaturalización y extensión, la temperatura de alineamiento no es la misma en todas las PCRs (Brown, 2000). Idealmente la temperatura de alineamiento es de 2 a 4 °C debajo de la temperatura de fusión (Tm) del par de cebadores usados en la PCR (Brown, 2000).

La temperatura de fusión (Tm) puede ser hallada desde la siguiente formula (Brown, 1994; Brown, 2000):

$$Tm = 4 (\#G + \#C) + 2 (\#A + \#T)$$

Esta estimación no es enteramente certera y la actual Tm de un cebador puede ser baja o alta, especialmente si la secuencia incluye un número elevado de As y Ts (dando bajos Tm) o de Gs y Cs (dando elevados Tm) (Brown, 2000).

La temperatura de alineamiento de un nuevo par de cebadores puede ser optimizada por series de PCRs con temperaturas de alineamiento en rangos de 8 °C debajo hasta 4°C encima de la Tm estimada, variando en incrementos de 2°C (Aert *et al*., 1998; Brown, 2000). Si la temperatura de alineamiento es baja, los errores entre cebadores y ADN molde pueden ser tolerados, incrementando el número de potenciales sitios de mal alineamiento y amplificación de productos no deseados (Brown, 2000).

5.3.3 ADN molde

La PCR puede ser realizada con casi cualquier preparación de ADN, aunque sales de acetato y SDS pueden reducir el rendimiento del producto (Brown, 2000). Si el ADN es disuelto en Solución tampón TE, cuando incrementamos la cantidad de ADN en la PCR también incrementamos la cantidad de EDTA, el cual podría quelar al Mg^{2+} reduciendo la concentración efectiva de este ión en la reacción (Brown, 2000). Aunque ADN relativamente impuro puede ser usado en la PCR, algunas fuentes de ADN (muestras arqueológicas) pueden contener inhibidores de la *Taq* polimerasa los cuales impiden la realización de la PCR (Brown, 2000).

5.3.4 Concentración de iones de Magnesio

La interacción entre la *Taq* polimerasa y el ADN molde es magnesio dependiente. La concentración optima puede ser determinado experimentalmente, cada vez que una nueva PCR es designada (Brown, 2000). Este punto óptimo puede estar comprendido entre 1.0 mM y 5.0 mM Mg^{2+}, para determinarlo es necesario probar concentraciones de Mg^{2+} en distintas PCRs incrementando en 0.5 mM (Aert *et al.*, 1998; Brown, 2000).

La optimización de la concentración de Mg^{2+} es realizada por comparación del rendimiento del producto en un gel de agarosa, esto se realiza preferentemente después que ha sido determinada una apropiada temperatura de alineamiento del cebador (Brown, 2000).

La disponibilidad de iones Mg^{2+} es también influenciada por la concentración de EDTA, siendo necesario incrementar la concentración de Mg^{2+}, si EDTA extra es adicionado en la PCR con el ADN molde (Brown, 2000).

6. ELECTROFORESIS DE ADN

6.1 Concepto de electroforesis

La electroforesis es definida como la migración de partículas (iones y macromoléculas) cargadas a través de un medio estabilizante, bajo la influencia de un campo eléctrico (Karcher, 1995; Robinson & Lafleche, 2000), convencionalmente es llevada en una fase de solución (Brown, 1994). La agarosa y la poliacrilamida son los medios estabilizantes usados en electroforesis de macromoléculas (Karcher, 1995; Robinson & Lafleche, 2000), estos medios previenen disturbios mecánicos y de convección durante la electroforesis y sirven como un tamiz molecular (Karcher, 1995).

6. 2 Electroforesis de ADN

Las moléculas de ADN tienen carga eléctrica negativa, cuando dichas moléculas son colocadas en un campo eléctrico migraran hacia el polo positivo este proceso es llamado electroforesis de ADN (Brown, 1994). En general los ácidos nucleicos migran a través del gel basados en su tamaño, con una pequeña influencia de la composición de bases a diferencia de las proteínas, que se separan a través de la matriz basadas en su tamaño, estructura y carga (Berger & Kimmel, 1987; Robinson & Lafleche, 2000; Sealey & Southern, 1982).

6.3 Electroforesis engeles de agarosa

6.3.1 Agarosa

La agarosa es un polisacárido lineal extraído del agar, obtenido de varias especies de algas marinas rojas de los géneros *Geliddium* y *Gracilaria*. La unidad básica de la agarosa es la agarobiosa, la cual forma largas cadenas de aproximadamente 400 unidades, con un promedio de masa molecular de 120 KDa (Robinson & Lafleche, 2000).

6.3.2 Propiedades de la agarosa

a. Tamaño de los poros: el promedio del tamaño de los poros en un gel de agarosa, varia con la concentración, pero esta comprendido entre 100-300 nm (Robinson & Lafleche, 2000), debido a esto permite fácil y eficientemente separar grandes fragmentos de ADN de doble cadena tan solo variando su concentración (Sealey & Southern, 1982).
b. Temperatura de fusión y gelificación: la energía necesaria para fundir un gel de agarosa incrementa por medio de la concentración del gel, debido a esto, las temperaturas de gelificación y fusión son expresadas según la concentración del gel de agarosa siendo esto mas pronunciado en geles de concentraciones menores al 1% (Robinson & Lafleche, 2000).
c. Resistencia del gel: una de los más importantes factores que contribuyen al éxito de la agarosa como un medio de anticonvección es su habilidad para exhibir alta solidez del gel a bajas concentraciones (menores al 6%) (Robinson & Lafleche, 2000). La resistencia del gel esta definida como la fuerza expresada en g/cm^2 que es necesario aplicar para romper el gel (Robinson & Lafleche, 2000).

6.3.3 Fundamento de la formación del gel

El mecanismo de gelificación de la agarosa es el resultado de un proceso físico, debido a un cambio en la conformación de las moléculas que la conforman (Barber, 2001). La agarosa en su forma original esta compuesta por un enrollado al azar de polisacáridos. Cuando se encuentra en solución estos rollos de polisacáridos adoptan una conformación helicoidal (forma de doble hélice) en etapas iniciales de la gelificación y después debido a que cada molécula de polisacárido participa en la formación de una estructura de doble hélice, esto resulta en una masa enmarañada de moléculas (gel) con espacios entre las hélices que actúan a modo de poros. El tamaño de los poros no es particularmente regular, además, puede ser controlado variando la concentración de la agarosa en la solución (Robinson & Lafleche, 2000; Barber, 2001). Estos enlaces cruzados entre los polímeros de agarosa se realiza a través de puentes de hidrogeno (Karcher, 1995).

6.3.4 Ventajas y desventajas de los geles de agarosa

a. Forma macroporos los cuales permiten la rápida difusión de macromoléculas de alto peso molecular (1000 KDa) sin restricción significante por el gel (Karcher, 1995; Robinson & Lafleche, 2000). Variando la concentración de la agarosa y/o el Solución tampón es posible separar satisfactoriamente ADN doble cadena en un rango de tamaño de aproximadamente 20 bp a 50 kb, fragmentos mas pequeños (resolución de 2 bp) no son posibles de separar mediante esta técnica (Tabla 3) (Robinson & Lafleche, 2000).
b. La agarosa no es tóxica y a diferencia de la poliacrilamida no contiene productos dañinos derivados de la polimerización y no requiere de radicales libres para su polimerización (Robinson & Lafleche, 2000).
c. Los geles de agarosa son termoreversibles (Robinson & Lafleche, 2000).
d. La agarosa tiene una gran resistencia, permitiendo el uso de concentraciones menores al 1% (Robinson & Lafleche, 2000).
e. Rápida coloración y decoloración puede ser optimizada con un mínimo de background (Robinson & Lafleche, 2000).
f. El método es fácil y simple de realizar (Karcher, 1995).

Tabla 3. Rango óptimo de separación en geles de agarosa

Agarosa	Rango óptimo de separación (Kb)
0.3%	60 - 5.0
0.6%	20 - 1.0
0.7%	10 - 0.8
0.9%	7 - 0.5
1.2%	6 - 0.4
1.5%	4 - 0.2
2.0%	3 - 0.1

Fuente: Modificado de Karcher (1995) y Maniatis *et al*. (1982).

6.3.5 Visualización de fragmentos

La técnica mas común y rápida para la visualización de fragmentos de ADN en geles de agarosa es la fluorescencia usando bromuro de etidio (EtBr). El bromuro de etidio (EtBr) es un tinte fluorescente el cual detecta ADN de simple y doble cadena (Robinson & Lafleche, 2000). El EtBr se intercala entre las bases del ADN resultando en un incremento en el campo de la fluorescencia, cuando el complejo ADN-EtBr es expuesto a radiación ultravioleta (UV) (Karcher, 1995; Robinson & Lafleche, 2000). El EtBr absorbe luz en un rango de 300 a 350 nm y emite luz a 590 nm, siendo 300 nm, la longitud de onda óptima para observar fluorescencia del complejo ADN-EtBr (Karcher, 1995). Mediante esta técnica se puede detectar cantidades mínimas de ADN (1 a 10 ng) en un gel de agarosa (Karcher, 1995; Maniatis *et al*., 1982; Robinson & Lafleche, 2000). La máxima cantidad de ADN que puede ser cargada en los pozos del gel de agarosa sin perder la definición de las bandas es cerca de 100 ng (Robinson & Lafleche, 2000). El EtBr puede ser adicionado directamente al gel de agarosa en el momento de su preparación o puede usarse una solución de EtBr luego de la electroforesis para teñir el gel de agarosa (Karcher, 1995).

6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida

6.4.1 Acrilamida y bisacrilamida

Son monoméricas unidades que forman la matriz del gel, ambas son usualmente obtenidas en forma de polvos y son preparadas en alícuotas para la elaboración de los geles (Brown, 1994). Los geles de poliacrilamida son formados por la polimerización de los monómeros de acrilamida dentro de largas cadenas con enlaces cruzados por unidades de N-N' metileno-bis-acrilamida (Brown, 1994).

6.4.2 Propiedades de la acrilamida y bisacrilamida

a. El tamaño de los poros: Los tamaños de los poros están determinados por la concentración de los monómeros de acrilamida en la solución de polimerización

(Barber, 2001; Brown, 1994). En la practica, los enlaces cruzados son maximizados cuando usamos una relación de 19:1 (acrilamida:bisacrilamida) (Barber, 2001).

b. Son potentes neurotoxinas: la acrilamida y la bisacrilamida son potentes neurotoxinas que ingresan al cuerpo por inhalación o a través de la piel (Barber, 2001; Brown, 1994).

6.4.3 Ventajas y desventajas de los geles de poliacrilamida

a. La poliacrilamida forma geles con poros de un tamaño uniforme y de un rango de tamaño mucho mas amplio que en los geles de agarosa (Barber, 2001).
b. Los geles de poliacrilamida pueden ser usados para separar moléculas que difieren en tamaño por tan solo el 2% de su peso molecular (Barber, 2001).
c. La acrilamida es particularmente superior cuando se necesita obtener un tamaño muy pequeño de los poros, pudiendo ser usada para separar efectivamente moléculas pequeñas (oligonucleótidos de 100 bp o menos), que no pueden ser separados óptimamente en geles de agarosa (Tabla 4 y 5) (Maniatis *et al.*, 1982; Barber, 2001).
d. El gel de poliacrilamida es una matriz que es mucho más fuerte que la agarosa, produciendo geles que no se rompen rápida y fácilmente (Barber, 2001).
e. Presenta relativa pureza, debido a esto es posible cargar largas cantidades de muestra en el gel y recuperar la muestra en una forma muy pura (Barber, 2001)
f. Los geles de poliacrilamida son difíciles de preparar si los comparamos con los geles de agarosa y el riesgo asociado con su preparación es mucho mayor (Barber, 2001).

Tabla 4. Rango de separación lineal de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS

Porcentaje de Acrilamida (19:1 acrilamida:bis)	Rango de tamaño (Kilodaltons)
15.0	15-45
12.5	15-60
10.0	18-75
7.5	30-120
5.0	60-212

Fuente: Modificado de Barber (2001).

Tabla 5. Rango de separación de ácidos nucleicos en gel de poliacrilamida desnaturalizado

Porcentaje de Acrilamida (19:1 acrilamida:bis)	Rango de tamaño (bp)
20.0	6-1000
15.0	25-150
12.0	40-200
8.0	60-400
5.0	80-500
3.5	1000-2000

Fuente: Modificado de Barber (2001).

6.4.4 Fundamento de la formación del gel

La formación de poros en el gel de poliacrilamida es un proceso químico a diferencia de los geles de agarosa, y es resultado de la acción combinada de polimerización química y enlaces químicos cruzados (Barber, 2001; García 2000). El resultado es una regular matriz con un tamaño uniforme de los poros. La poliacrilamida esta compuesta de dos sustancias químicas la monoacrilamida y la bisacrilamida (N,N' methylene-bis-acrylamide) (Barber, 2001; García 2000).

Esencialmente dos moléculas de acrilamida se acoplan por medio de un grupo metilo, en presencia de radicales libres (proveídos por el persulfato de amonio) y la reacción es catalizada por el N, N, N', N' – tetrametilenediamina (TEMED) (Barber, 2001; García 2000). Los monómeros de acrilamida polimerizan formando largas cadenas y las moléculas de bisacrilamida son incorporadas dando como resultado enlaces cruzados entre las cadenas de polímeros de acrilamida, formándose una matriz regular con agujeros que sirven como poros en el gel de poliacrilamida (Barber, 2001; Brown, 1994; García, 2000).

6.4.5 Tipos de geles de poliacrilamida

6.4.5.1 Geles nativos

Los geles de poliacrilamida nativos contienen solo acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amonio (APS) y N, N, N', N' – tetrametilenediamina (TEMED), sin ningún aditivo especial. Los geles nativos son usados para recuperar proteínas u otras biomoleculas en su forma biológicamente activa. Los geles nativos son mas recomendados para usar, pero tienen una significante limitación, no pueden ser usados para separar mixturas de proteínas en base a su tamaño (Barber, 2001). Geles de poliacrilamida nativos pueden ser usados para la separación de fragmentos de ADN de doble cadena entre 6 bp (20% de acrilamida) y 1000 bp (3% de acrilamida) (Barber, 2001; García, 2000).

6.4.5.2 Geles desnaturalizados

Los geles de poliacrilamida desnaturalizados contienen aditivos que mantienen a las moléculas separadas en un estado desnaturalizado. En el caso del ADN, mantienen a las moléculas de ADN doble cadena en su forma de simple cadena (Barber, 2001). Dos desnaturalizantes son comúnmente usados junto con la poliacrilamida para el fraccionamiento de ácidos nucleicos de simple cadena: urea a una concentración final de 7M o Formamida al 98% (Barber, 2001; García, 2000).

La elección del desnaturalizante depende mayormente del tamaño de la molécula. La urea es comúnmente usada para separar cadenas pequeñas (encima de los 200 nucleótidos), debido a que cadenas largas y aquellas que contienen considerable complementariedad pueden detener su estructura secundaria en la urea, y la formamida al 98% puede ser necesaria para dar un tamaño preciso y una buena resolución (Berger & Kimmel, 1987).

6.4.6 Preparación de soluciones de poliacrilamida

Usualmente se prepara soluciones al 40% de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida (38% de acrilamida y 2% de bisacrilamida) para ser usadas en la elaboración de los geles de poliacrilamida (Barber, 2001; Brown, 1994; Sealey & Southern, 1982).

6.5 Soluciones Tampón de electroforesis

Las formulas para elaborar los dos principales soluciones tampón de electroforesis son descritos en la Tabla 6.

Tabla 6. Formulas de elaboración de soluciones tampón de electroforesis

Solución Tampón	Formula	Concentración 1X
50X TAE (Tris Acetato EDTA Solución tampón)	242 g Tris base 57.1 ml de Ácido acético glacial 18.61 g $Na_2EDTA\text{-}2H_2O$ Adicionar H_2Od (agua destilada) hasta 1 L	40 mM Tris base 40 mM Ácido acético 1 mM EDTA
5X TBE (Tris Borato EDTA Solución tampón)	54.0 g de Tris base 27.5 g Ácido bórico 3.72 g $Na_2EDTA\text{-}2H_2O$ Adicionar H_2Od hasta 1 L Ajustar el pH a 8.0	89 mM Tris base 89 mM Ácido bórico 2 mM EDTA
10X TBE (Tris Borato EDTA Solución tampón)	108.0 g de Tris base 55.0 g Ácido bórico 7.44 g $Na_2EDTA\text{-}2H_2O$ Adicionar H_2Od hasta 1 L Ajustar el pH a 8.0	89 mM Tris base 89 mM Ácido bórico 2 mM EDTA

Fuente: Modificado de Robinson & Lafleche (2000).

6.6 Solución tampón de carga de muestra

La solución tampón de carga tiene 3 propósitos principales en electroforesis de ADN: incrementar la densidad de la muestra, adicionar color a la muestra y facilitar el monitoreo de la electroforesis (Robinson & Lafleche, 2000). La solución tampón de carga contiene colorantes que poseen un campo eléctrico, por lo cual se mueven hacia el ánodo en un rango predecible, es así, que el azul de bromofenol migra a través del gel de agarosa aproximadamente 2.2 veces mas rápido que el xilene cianol FF, independientemente de la concentración del gel (Robinson & Lafleche, 2000). Los distintos rangos de co-migración de fragmentos de ADN tanto para geles de agarosa como poliacrilamida están descritos en la Tabla 7 y 8 respectivamente. Existen varios tipos de Solución tampón de carga que varían en su composición y son detallados en la Tabla 9.

Tabla 7. Migración del colorante marcador en geles de agarosa

% Gel	Tamaño ADNd* (kb) que co-migra con el tinte	
	Azul de Bromofenol	**Xilene Cianol**
0.6	0.7 – 1.2	9.0 – 10.0
0.7	0.6 – 0.8	6.0 – 7.0
0.9	0.3 – 0.4	3.0 – 4.0
1.2	0.18 – 0.21	1.4 – 1.9
1.5	0.12 – 0.14	0.8 – 1.4
2.0	Menor a 0.1	0.8 – 0.9

* ADN doble cadena
Fuente: Modificado de Karcher (1995) y Maniatis *et al*. (1982).

Tabla 8. Migración del colorante marcador en geles de poliacrilamida

% Gel	Tamaño ADNd* (bp) que co-migra con el tinte	
	Azul de Bromofenol	Xilene Cyanol
3.5%	100	460
5.0%	65	260
8.0%	45	160
12.0%	20	70
20.0%	12	45

* ADN doble cadena
Fuente: Modificado de Karcher (1995) y Maniatis *et al*. (1982).

Tabla 9. Composición de las distintas soluciones tampón de carga

Tipo de Solución	6X Solución Tampón	T° Almacenamiento
I	0.25% Azul de bromofenol 0.25% Xilene cianol FF 40% w/v sucrosa en H_2O	4°C
II	0.25% Azul de bromofenol 0.25% Xilene cianol FF 15% Ficoll (Tipo 400) en H_2O	Temperatura ambiente
III	0.25 Azul de bromofenol 0.25% Xilene cianol FF 30% Glicerol en H_2O	4°C

Fuente: Modificado de Robinson & Lafleche (2000).

7. DETERMINACIÓN DE PARENTESCO

7.1 EXCLUSIÓN

Las técnicas para determinación de parentesco se basan en la exclusión genética (Bernoco *et al.*, 1997; Jones & Ardren, 2003). El proceso de exclusión (basada en las leyes de herencia mendeliana) usa incompatibilidades genéticas entre los supuestos padres y las crías, para rechazar una particular hipótesis de asignación de paternidad (Jones & Ardren,

2003). Por ejemplo, en una prueba de paternidad, se tiene una madre y una cría que tienen un genotipo diploide AA y AB respectivamente, para un simple locus, y dos machos uno con genotipo AC y el otro con genotipo BC, el primer macho podrá ser excluido en cambio el segundo no (Jones & Ardren, 2003). La eficiencia de un sistema de marcadores genéticos para uso en pruebas de paternidad es juzgado usualmente por la probabilidad con que dicho sistema (locus) excluiría un falsamente acusado macho (Lee *et al.*, 2000) y esto depende de su número de alelos y de sus frecuencias (Sandberg & Cothran, 2000) (Figura 4).

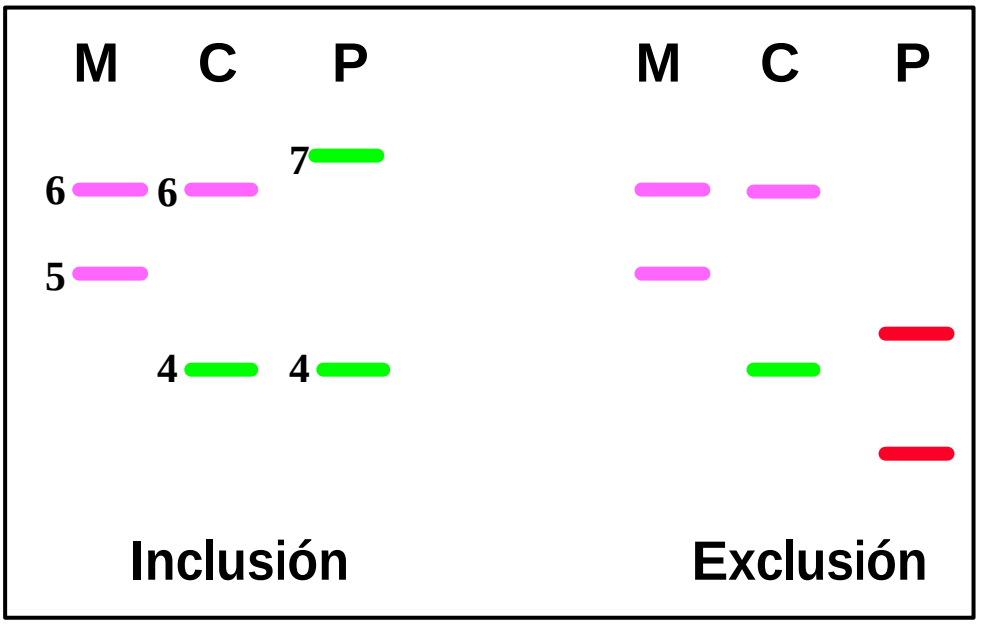


Figura 4. Inclusión y exclusión genética. Diagrama explicativo.

M = Madre, C = Cría y P = Alegado Padre. Los números indican diferentes tamaños de los alelos para dicho marcador microsatélite. Obsérvese que en el caso de inclusión genética, la cría comparte un alelo con la madre y el otro con el alegado padre, y en el caso de exclusión la cría sólo comparte un alelo con la madre y ninguno con el alegado padre.

Bajo estricta exclusión, una simple incompatibilidad es suficiente para excluir a un candidato a pariente, sin embargo, algunos programas de exclusión pueden permitir al usuario especificar el número de incompatibilidades necesarias para que la exclusión sea considerada valida, haciendo el método mas robusto para las dificultades impuestas por mutaciones o errores de lectura e interpretación (Jones & Ardren, 2003). Pruebas de

paternidad en humanos demuestran "no paternidad" con al menos dos exclusiones independientes (Dawid *et al.*, 2001).

7.2 DETERMINACIÓN DE PROBABILIDAD DE EXCLUSIÓN

7.2.1 Probabilidad de Exclusión (PE) para un locus

Jamieson & Taylor (1997) describen tres formulas distintas para determinar la **Probabilidad de exclusión (PE)**, dependiendo de los datos disponibles para el análisis.

a. Caso 1: Cuando se conocen los genotipos del padre, madre y cría.

La formula de exclusión general para "n" alelos, cuando se dispone de los genotipos del padre, madre y cría (Jamieson, 1965; Jamieson 1966; Jamieson & Taylor, 1997).

$$P = \sum_{i}^{n} p_i(1-p)^2 - \sum_{i>j=1}^{n} (P_i P_j)^2 [4 - 3(P_i + P_j)]$$

La formula para simplificarla es expresada en función de probabilidades alélicas (p_i):

$$P = 1 - 2\sum_{i=1}^{n} p_i^2 + \sum_{i=1}^{n} p_i^3 + 2\sum_{i=1}^{n} p_i^4 - 3\sum_{i=1}^{n} p_i^5 - 2\left(\sum_{i=1}^{n} p_i^2\right)^2 + 3\sum_{i=1}^{n} p_i^2 \sum_{i=1}^{n} p_i^3$$

P = Probabilidad de Exclusion

p_i = Probabilidades alélicas

Cuando todas las frecuencias alélicas p_i son equivalentes:

$p_i = 1/n$

La formula se transforma en:

$$\mathbf{P_{max} = n^{-4}\ (n-1)(n^3 - n^2 - 2n + 3)}$$

Que son los teóricos máximos poderes de exclusión.

b. Caso 2: Uno de los genotipos (paternal o maternal) no esta disponible.

La formula general es (Garber & Morris, 1983):

$$\mathbf{P_{En}} = \sum_{i=1}^{n} \mathbf{p_i^2\ (1-p_i)^2} + \sum_{i>j=1}^{n} \mathbf{2P_iP_j\ (1-P_i-P_j)^2}$$

La formula para simplificarla requiere ser expresada en función a probabilidades alélicas ($\mathbf{p_i}$ **):**

$$\boldsymbol{P} = \mathbf{1} - \mathbf{4}\sum_{i=1}^{n} \mathbf{p_i^2} + \mathbf{2}\left(\sum_{i=1}^{n} \mathbf{p_i^2}\right)^2 + \mathbf{4}\sum_{i=1}^{n} \mathbf{p_i^3} - \mathbf{3}\sum_{i=1}^{n} \mathbf{p_i^4}$$

$\boldsymbol{P}$ = Probabilidad de Exclusión

$\mathbf{p_i}$ = Probabilidades alélicas

Cuando todas las frecuencias alélicas Pi son equivalentes:

$\mathbf{p_i} = 1/n$

La formula se transforma en:

$$\mathbf{P_{max} = n^{-3}\ (n-1)(n^2 - 3n + 3)}$$

c. **Caso 3: Cuando se tiene los genotipos de ambos parientes y de una de las crías y se quiere excluir a ambos parientes.**

Si la paternidad es falsamente atribuida a dos parientes, los tres genotipos son probados con marcadores codominantes. La probabilidad exclusión se puede hallar por medio de la siguiente formula (Jamieson & Taylor, 1997):

$$\boldsymbol{P} = 1 + \sum_{i=1}^{n}[p_i^{2}(2-p_i)]^2 - 2\sum_{i=1}^{n}[p_i^{2}(2-p_i)]^2 + 4\left(\sum_{i=1}^{n} p_i^{3}\right)^2 - 4\sum_{i=1}^{n} p_i^{6}$$

La formula para simplificarla es expresada en función de probabilidades alélicas ($\mathbf{p_i}$):

$$\boldsymbol{P} = 1 + 4\sum_{i=1}^{n} p_i^{4} - 4\sum_{i=1}^{n} p_i^{5} - 3\sum_{i=1}^{n} p_i^{6} - 8\left(\sum_{i=1}^{n} p_i^{2}\right)^2 + 8\left(\sum_{i=1}^{n} p_i^{2}\right)\left(\sum_{i=1}^{n} p_i^{3}\right) + 2\left(\sum_{i=1}^{n} p_i^{3}\right)^2$$

$\boldsymbol{P}$ = Probabilidad de Exclusión

$\mathbf{p_i}$ = Probabilidades alélicas

Cuando todas las frecuencias alélicas $\mathbf{p_i}$ son equivalentes:

$\mathbf{p_i} = 1/n$

La formula se transforma en:

$$\mathbf{P_{max} = n^{-5}(n-1)(n^4 + n^3 - 7n^2 + 5n + 3)}$$

7.2.2 Probabilidad de Exclusión (PE) acumulada para k loci microsatélites

La **Probabilidad de exclusión (PE)** acumulada para "k" loci microsatélites analizados es hallada mediante la siguiente formula (Jamieson & Taylor, 1997):

$$P = 1 - (1 - P_1)(1 - P_2)(1 - P_3) \ldots (1 - P_k)$$

Donde: P = Probabilidad de Exclusión acumulada

P_1, P_2, P_3, P_k = Probabilidades de Exclusión de cada locus microsatélite

8. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE PARENTESCO

Hay una amplia gama de técnicas para la determinación de parentesco tanto en animales como en humanos. La técnica ideal para determinar parentesco debe tener las siguientes características (Bernoco *et al.*, 1997):

a. Ser de herencia simple y conocida.
b. Estar desarrollada desde el nacimiento o poco después manteniéndose por toda la vida y no ser influenciada por el clima, enfermedades o cualquier otro agente genético o ambiental.
c. Su detección debe ser posible por pruebas objetivas y confiables, las cuales deben ser realizadas e interpretadas por personas totalmente calificadas en el uso de dicha metodología.

8.1 TIPIFICACIÓN DE GRUPOS Y POLIMORFISMOS DE PROTEÍNAS SANGUÍNEAS

Los grupos sanguíneos son determinados por la presencia o ausencia de antígenos en la superficie de los glóbulos rojos. Estos son detectados por pruebas serológicas que usan anticuerpos específicos para cada factor del grupo sanguíneo (Penedo, 1996).

Los polimorfismos de proteínas sanguíneas son detectados por electroforesis en gel (Penedo, 1996). Las pruebas de tipificación sanguínea han sido extremadamente usadas en identificación de paternidad comparando los tipos de sangre de la cría, madre, y potenciales padres (Penedo, 1996).

Las pruebas de tipificación sanguínea y polimorfismo proteico tienen una eficacia de cerca del 95 % (Penedo, 1996), pero el nivel de variación individual de cada sistema de tipificación sanguínea y/o polimorfismo proteico es bajo, haciendo necesario el uso de varios sistemas para obtener adecuados rangos de eficacia en pruebas de paternidad (Thomson & Esposito, 1999), lo cual encarece y retrasa la prueba (San Primitivo, 2001).

En algunas especies como el bisón (*Bison bison*) no es factible la asignación de paternidad en base al uso de grupos sanguíneos y polimorfismo proteico debido a los bajos niveles de variación de dichos marcadores para esta especie (Mommens *et al.*, 1998).

Pruebas de paternidad en camélidos sudamericanos por medio de tipificación sanguínea utilizan 6 marcadores de grupos sanguíneos (A, B, C, D, E, F) y 5 marcadores de polimorfismo proteico (CAT, GPI, TF, Pa1, Pa2) (Tabla 10), lo cual ha permitido reportar una probabilidad de exclusión de 0.883 para llamas y 0.681 para alpacas (Penedo, 1996).

Tabla 10. Descripción de 16 sistemas de tipificación sanguínea utilizados en pruebas de paternidad en alpacas y llamas

Nombre del Sistema	Tipo de Marcador	Número de Variantes	Nombre de las Variantes*
A	Grupo sanguíneo	2	A,B
D	Grupo sanguíneo	2	D,-
F	Grupo sanguíneo	2	F,-
A1B (alfa-1B-glicoproteína)	Proteína plasmática	5	A,C,D,F,S
CAT (catalasa)	Enzima de eritrocito	2	F,S
C3 (Componente del complemento)	Proteína plasmática	11	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11
ESD (esterasa-D)	Enzima de eritrocito	3	F,S,L
GC (vitamina D pegada a proteína)	Proteína plasmática	6	B,E,H,K,L,N
GPI (glucosa fosfato isomerasa)	Enzima de eritrocito	3	F,I,S
Pa1 (post-albúmina 1)	Proteína plasmática	2	F,S
Pa2 (post-albúmina 2)	Proteína plasmática	3	A,B,C
PGD (fosfogluconato dehidrogenasa)	Enzima de eritrocito	2	F,S
Pi1(Inhibidor de proteína 1)	Proteína plasmática	2	A,B
Pr (pre-albúmina)	Proteína plasmática	2	F,S
Prt (pre-transferrina)	Proteína plasmática	2	F,S
TF (transferrina)	Proteína plasmática	13	C,F,G,I,K,L,O,Q,R,S,T,U,X,Z

*El guión (-) significa "ausencia de D (o F)" o negativo (-) para esos factores.
Fuente: Penedo (1996)

En equinos en pruebas de determinación de paternidad, se utilizan 15 sistemas de marcadores sanguíneos: 7 sistemas de grupo sanguíneo (EAA, EAC, EAD, EAK, EAP, EAQ y EAU) y 8 sistemas de polimorfismo de proteínas sanguíneas (ALB, A1B, ES, GC, HBA, PGD, PI y TF) (Tabla 11), reportando rangos de probabilidad de exclusión de 0.90 a 0.97 (Sandberg & Cothran *et al*., 2000) pudiendo incluso llegar a 0.99 (Binns *et al.*, 2000).

Tabla 11. Descripción de 15 sistemas de tipificación sanguínea utilizados en pruebas de paternidad en equinos

Nombre del Sistema	Tipo de Marcador	Número de Variantes
EAA	Grupo sanguíneo	12
EAC	Grupo sanguíneo	2
EAD	Grupo sanguíneo	26
EAK	Grupo sanguíneo	2
EAP	Grupo sanguíneo	8
EAQ	Grupo sanguíneo	7
EAU	Grupo sanguíneo	2
A1B (alfa-1B-glicoproteína)	Proteína plasmática	3
ALB (Albúmina)	Proteína plasmática	3
ES (Carboxilesterasa sérica)	Enzima de eritrocito	10
GC (Proteína de pegado de vitamina D)	Proteína plasmática	2
HBA (Hemoglobina alfa)	Proteína plasmática	4
PGD (Fosfogluconato dehidrogenasa)	Enzima de eritrocito	3
PI (Inhibidor de proteasas)	Proteína plasmática	25
TF (Transferrina)	Proteína plasmática	13

Fuente: Sandberg & Cothran *et al*. (2000).

8.2 HUELLA DACTILAR GENÉTICA

La Huella Dactilar Genética o ADN fingerprinting es llamado así porque genera una colección de datos sobre bandas de ADN distintivas de cada individuo semejante a una huella digital. Esta técnica se fundamenta en que dos individuos no tienen un idéntico patrón de bandas de ADN, excepto los gemelos idénticos, sin embargo, todas las bandas de

ADN encontradas en una cría debe estar presente en uno o los dos parientes (Penedo, 1996).

Este método tiene sus serias limitaciones:

a. Usa distintos registros que los de tipificación sanguínea y polimorfismo proteico (Penedo, 1996).
b. Los datos obtenidos son difíciles de almacenar en bases de datos computarizadas, lo cual no permite generar registros permanentes (Bernoco *et al.*, 1997).
c. Es una prueba mas costosa que la de tipificación sanguínea y polimorfismo proteico (Penedo, 1996).
d. El procedimiento es difícilmente automatizable y laborioso (Penedo, 1996).

La huella dactilar genética sirvió para resolver casos de paternidad que no pudieron ser resueltos por pruebas de tipificación sanguínea y de polimorfismo proteico, pero no es de uso rutinario (Bernoco *et al.*, 1997; Penedo, 1996).

8.3 POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) - MINISATÉLITES

Los RFLPs son causados por modificaciones del ADN, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o simples nucleótidos, lo que significa la ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos de restricción del ADN genómico al ser hibridado con una sonda especifica (Becerra & Paredes, 2000). Los RFLPs constituyen una técnica confiable que puede ser usado para determinar acertadamente genotipos debido a su elevado polimorfismo (Areshchenkova, 2000).

Los RFLPs se heredan en forma mendeliana simple (Becerra & Paredes, 2000), son codominantes, lo cual permite identificar todas las formas alélicas del gen (homocigotos y

heterocigotos), además, identifican un único locus analizando las variaciones en los alelos (bialélicos o multialélicos) (Areshchenkova, 2000; Becerra & Paredes, 2000).

La técnica de RFLP tiene ciertas limitaciones:

a. Requiere una gran cantidad de ADN (50 – 200 ug) por individuo (Areshchenkova, 2000; Binns *et al.*, 2000).
b. Especies estrechamente relacionadas usualmente contienen los mismos alelos (Areshchenkova, 2000; Binns *et al*., 2000).
c. Es una técnica laboriosa, lenta y cara, debido a la clonación de las sondas, detección de fragmentos de restricción en las membranas y el uso de radioactividad (Becerra & Paredes, 2000).

8.4 SNPs

Es una técnica de tipificación de ADN basada en el polimorfismo de simple de nucleótido (SNPs) que son el tipo más común de variantes de ADN, estas alteraciones pueden ser causadas por deleciones, inserciones o sustituciones de bases (Bernoco *et al*., 1997). En promedio, dos o tres sitios polimórficos son encontrados por cada par de kilobases en los genomas de mamíferos.

Se están desarrollando métodos de análisis de paternidad basados en SNPs, pero tienen la desventaja de ser menos informativos, requiriendo un elevado número de marcadores para obtener una aceptable probabilidad de exclusión, pero tienen la potencial ventaja de automatizar los resultados (Binns *et al*., 2000).

8.5 MICROSATÉLITES

Los microsatélites debido a sus características y capacidad de detectar polimorfismo genético, aun en especies en la que los marcadores clásicos no son capaces de hacerlo, resultan ser marcadores adecuados para identificación individual, controles de paternidad y control genealógico (Binns *et al.*, 2000; Morera *et al.*, 1999; San Primitivo, 2001). La

determinación de paternidad o parentesco en animales por medio del análisis de loci microsatélites esta difundido en muchas de las especies domesticas y es utilizada con frecuencia en animales silvestres (Becerra & Paredes, 2000). Debido a la alta heterocigocidad de este tipo de marcador, es utilizado en mapeo de características cuantitativas (QTLs) y estudios de flujo genético en distintas especies (Becerra & Paredes, 2000).

El uso de un grupo de marcadores microsatélites no relacionados, de alto polimorfismo, bajo nivel de mutación, fácil medición e interpretación de resultados y su uso, juntos en una simple reacción de PCR los hacen validos para pruebas de verificación de parentesco (Binns *et al.*, 2000).

Estudios realizados en camélidos sudamericanos: guanaco (*Lama guanicoe*) y llama (*Lama glama*) analizando 6 loci microsatélites permitieron estudiar variabilidad genética reportando probabilidades de exclusión acumuladas de 0.993 y 0.998 en llama y guanaco respectivamente, permitiendo su uso en pruebas de paternidad en ambas especies (Sarno *et al.*, 2001), a su vez, otro estudio permitió determinar paternidad en un híbrido entre hembra guanaco y el macho camello utilizando 8 loci microsatélites con una probabilidad de exclusión combinada de 0.9997 (Skidmore *et al*., 1999). Similares estudios realizados en camélidos del viejo mundo (*C. dromedarius*), encontraron que de 37 loci microsatélites para camélidos sudamericanos analizados, 27 amplificaron en *C. dromedarius*, de los cuales un total de 16 resultaron ser marcadores altamente polimórficos con valores de probabilidad de exclusión individual que varió entre 0.2 – 0.7 y con una probabilidad acumulada de 0.99997, siendo probados en pruebas de paternidad (Sasse *et al.*, 2000).

Marcadores microsatélites se están utilizando en estudios de análisis de variabilidad genética en razas caninas españolas (Alano español), mostrando una alta heterocigocidad (0.51 a 0.85), alta probabilidad de exclusión de cada locus microsatélite (hasta 0.7) y alta probabilidad de exclusión de paternidad acumulada (0.92) usando 4 loci microsatélite (Morera *et al.*, 1999). Otros estudios en caninos han demostrado que a pesar de la homogeneidad genética que presentan los perros de pedigrí, debido a la consanguinidad,

por medio del análisis de marcadores microsatélites se puede resolver la asignación de paternidad en razas puras (Padar *et al.*, 2001).

En distintas razas porcinas es posible determinar parentesco e identidad analizando tan solo 8 loci microsatélites (Hutton *et al.*, 1998). En dos razas de ganado bovino doméstico (Brahman y Poll Herefords) es posible determinar paternidad utilizando 12 loci microsatélites con probabilidades de exclusión de 0.9931 y 0.8828 respectivamente (Kankan & Fado, 1999), en bóvidos silvestres como el bison (*Bison bison*) se reporta una probabilidad de exclusión acumulada de 0.97 utilizando 9 loci microsatélites (Mommens *et al.*, 1998). En caprinos también se utilizan marcadores microsatélites para la determinación de paternidad obteniendo una probabilidad de exclusión acumulada de 0.9999 mediante el uso de múltiples marcadores (Canovas & Galian, 2002). En ovinos es posible determinar paternidad utilizando 10 loci microsatélites y 5 sistemas de proteínas sanguíneas (Coltman *et al.*, 1999).

En la especie equina por medio del análisis de 13 loci microsatélites reportaron una alta probabilidad de exclusión acumulada (0.94) para ser utilizados en pruebas de parentesco (Bernoco *et al.*, 1997), otros estudios reportan una probabilidad de exclusión acumulada de 0.96 - 0.99 en base a 8 loci microsatelites (Binns *et al.*, 2000).

En equinos la verificación de parentesco es realizada por medio del análisis de 12 loci microsatélites y es comercialmente disponible a modo de kit (PE Applied Biosystems) estos marcadores pueden ser amplificados en dos reacciones de PCR múltiple, una con 8 marcadores y la otra con 4 marcadores por reacción (Binns *et al.*, 2000).

En primates no humanos como los chimpancés (*Pan troglodytes*) a través del análisis de 13 a 16 loci microsatélite se reportó una probabilidad de exclusión acumulada que varió entre 0.994 y 0.999 (Constable *et al.*, 2001), en otro estudio se analizaron 9 loci microsatélites reportando una probabilidad de exclusión acumulada mayor a 0.99 (Vigilant *et al.*, 2001).

En humanos, por medio del análisis de 12 loci microsatélites en dos reacciones de PCR múltiple se obtiene una alta discriminación en la prueba de paternidad con una probabilidad de exclusión acumulada de 0.9996, los no padres son excluidos usando tan solo con dos o mas sistemas microsatélites (Thompsom *et al.*, 1999), otros estudios de paternidad mediante el uso de 9 loci microsatélites reportaron una probabilidad de exclusión acumulada de 0.9962 (Halos *et al.*, 1999).

Estudios comparativos entre sistemas de marcadores microsatélites (16 sistemas) y sistemas de marcadores sanguíneos (20 sistemas) en humanos obtuvieron una probabilidad de exclusión acumulada de 0.9955 y 0.9242 respectivamente, con rangos promedios de probabilidades de exclusión individuales de 0.3655 y 0.1591 respectivamente demostrando la efectividad de los marcadores microsatélites sobre otros sistemas convencionales (Sawaguchi *et al.*, 2003), un estudio comparativo entre 10 loci microsatélites y 5 minisatélites en humanos encontraron similares resultados con probabilidades de exclusión acumuladas de 0.9999 (Jobim *et al*., 2003), además otro estudio demostró la factibilidad del uso de metodologías mixtas usando sistemas de marcadores microsatélites y minisatélites obteniendo resultados mucho mejores a los que se obtienen por separado (Henke *et al*., 1999).

Estudios realizados en aves (*Dendroica caerulescens*) en base a 5 loci microsatélites reportan una probabilidad de exclusión acumulada de 0.9998 (Chuang-Dobbs *et al.*, 2001). En peces los microsatélites son considerados como una poderosa herramienta para el estudio de parentesco y flujo genético en poblaciones mediante el uso de 7 loci microsatélites (Kenneth *et al*., 1996). Además con el uso de microsatélites es posible determinar paternidad en crías de tortuga verde (Chelonia mydas) (Ireland *et al*., 2003).

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Localización

El procesamiento y análisis de las muestras se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Virología y Genética molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) y en la Unidad de Biodiversidad y Procesos Ecológicos de la Universidad de Cardiff, Cardiff – Gales (Reino Unido).

1.2 Animales

Para la prueba de determinación de parentesco se utilizaron 47 alpacas (*Lama pacos*) previamente identificadas (padre, madre y cría) en los registros de la Estación Experimental del IVITA-Maranganí, ubicado en el distrito de Maranganí, provincia de Canchis, departamento de Cusco. La muestra colectada fue sangre extraída por punción en la vena yugular utilizando Tubos Vacutainer con anticoagulante (EDTA), durante el año 2000 (Tabla 12).

Tabla 12. Identificación de los animales de la Estación Experimental IVITA – Maranganí usados en el estudio

Código	Arete	Condición
1348	H045 P1	Padre 1
1349	H047 P2	Padre 2
1350	H067 P3	Padre 3
1351	H046 P4	Padre 4
1352	H033 M1	Madre 1
1353	H049 M2	Madre 2
1354	H015 M3	Madre 3
1355	H042 M4	Madre 4
1356	H011 C1	Cría 1
1357	H047 C2	Cría 2
1358	H051 C3	Cría 3
1359	H069 C4	Cría 4
1374	Padre 2	Padre 5
1377	Padre 6	Padre 6
1379	Padre 8	Padre 7
1380	Padre 9	Padre 8
1383	Padre 13	Padre 9
1385	Padre 16	Padre 10
1386	Padre 17	Padre 11
1388	Madre 4T	Madre 12
1389	Madre 44	Madre 5
1391	Madre 53	Madre 13
1392	Madre 31	Madre 14
1393	Madre 24	Madre 15
1395	Madre 12	Madre 16
1399	Madre 07	Madre 17
1401	Madre 42	Madre 7
1402	Madre 08	Madre 8
1403	Madre 54	Madre 18
1406	Madre 52	Madre 19
1407	Madre 19	Madre 9ª
1408	Madre 13	Madre 9B
1411	Madre 9	Madre 10
1415	Cría H040	Cría 12
1416	Cría H058	Cría 5
1418	Cría H013	Cría 13
1419	Cría H015	Cría 14
1420	Cría H021	Cría 15
1422	Cría H018	Cría 16

Tabla 12. Identificación de los animales de la Estación Experimental IVITA Maranganí usados en el estudio (Cont…)

Código	Arete	Condición
1426	Cría H011	Cría 17
1430	Cría H031	Cría 18
1433	Cría H056	Cría 19
1434	Cría H026	Cría 9A
1435	Cría H030	Cría 9B
1438	Cría H12C	Cría 10
1428	Cría S045	Cría 7
1429	Cría H001	Cría 8

2. METODOLOGÍA

2.1 Procedimientos

2.1.1 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de sangre, utilizando ULTRACLEAN DNA BloodSpin Kit® (Laboratorios Mo Bio Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml de capacidad y se almacenó en una congeladora a – 20°C.

Se determinó la calidad (tamaño del fragmento) y la cantidad (concentración) del ADN por comparación con diluciones seriadas de un marcador de peso molecular ? DNA *Hind* III® (AMRESCO) a una concentración de 50 ng/ul en un gel de agarosa al 0.8% (Linacero *et al.*, 1998; Zhang & Hewitt, 1998a).

2.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un equipo de electroforesis automatizado ABI 377 DNA sequencers® (Applied Biosystems)

Se analizaron 10 loci microsatélite utilizando los cebadores designados para llama (*Lama glama*) y alpaca (*Lama pacos*) descritos por Lang *et al.*, 1996 y Penedo *et al.*, 1998 (Tabla 13).

Se optimizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando 10 muestras de ADN de alpaca, tomando como referencia las condiciones descritas por Lang *et al.*, 1996 y Penedo *et al.*, 1998.

Distintas condiciones para la PCR fueron usadas para la amplificación de cada locus microsatélite, estas se obtuvieron luego del proceso de optimización (Tabla 14). Se realizó la reacción de PCR en un volumen final de 10 ul en un termociclador modelo 9700 GeneAmp® (Perkin Elmer).

Una vez optimizada la PCR para cada uno de los loci, se procedió a elaborar los patrones de tamaños alélicos para cada locus en estudio, para lo cual se utilizó un total de 6 muestras de ADN de alpaca. Se procuró que las 6 muestras de ADN contengan información sobre los distintos tamaños de alelos para cada uno de los loci microsatélites ha amplificar, estos datos fueron obtenidos durante la estandarización y optimización de la PCR (Tabla 15).

Se realizó PCR múltiple a 47 muestras de ADN de alpaca para determinar parentesco utilizando el kit QIAGEN Multiplex PCR Kit® (QIAGEN), siguiendo el protocolo para amplificación de microsatélites descrito en el manual del fabricante (QIAGEN, 2002).

Se analizaron 10 loci microsatélite usando 3 reacciones de PCR múltiple en un volumen final para cada PCR de 10 ul. Las condiciones de la PCR múltiple son detalladas en la Tabla 16.

Tabla 13. Loci microsatélites usados en pruebas de paternidad.

LOCUS	SECUENCIA DEL CEBADOR 5' – 3'	N° ALELOS	TAMAÑO ALELOS (BP)	PE*	Fuente
LCA 19 F	TAA GTC CAG CCC CAC ACT CA	14	84-118	0.555	Penedo *et al.*,1998
LCA 19 R	GGT GAG GGG CTT GAT CTT C				
LCA 22 F	TTA AGA GTC TAA AAG AGA AAG GCG	4	114-120	0.241	Penedo *et al.*,1998
LCA 22 R	CAG ATG ACA GCT GGG ATT GA				
LCA 5 F	GTG GTT TTT GCC CAA GCT C	11	180-204	0.532	Penedo *et al.*,1998
LCA 5 R	ACC TCC AGT CTG GGG ATT TC				
LCA 23 F	TCA CGG CAA AGA CGT GAA TA	11	131-159	0.626	Penedo *et al.*,1998
LCA 23 R	CCA GGA AAC ACA CAC CCA C				
YWLL08 F	ATC AAG TTT GAG GTG CTT TCC	13	135-177	0.569	Lang *et al.*, 1996
YWLL08 R	CCA TGG CAT TGT GTT GAA GAC				
YWLL29 F	GAA GGC AGG AGA AAA GGT AG	6	218-232	0.433	Lang *et al.*, 1996
YWLL29 R	CAG AGG CTT AAT AAC TTG CAG				
YWLL36 F	AGT CTT GGT GTG GTG GTA GAA	7	148-166	0.625	Lang *et al.*, 1996
YWLL36 R	TGC CAG GAT ACT GAC AGT GAT				
YWLL40 F	CAC ATG ACC ATG TCC CCT TAT	6	180-190	0.452	Lang *et al.*, 1996
YWLL40 R	CCA GTG ACA GTG TGA CTA AGA				
YWLL43 F	ATA CCT CTC TTG CTC TCT CTC	10	131-157	0.532	Lang *et al.*, 1996
YWLL43 R	CCT CTA CAA CCA TGT TAG CCA				
YWLL46 F	AAG CAG AGT GAT TTA ACC GTG	5	98-110	0.497	Lang *et al.*, 1996
YWLL46 R	GGA TGA CTA AGA CTG CTC TGA				

* Probabilidad de exclusión.

Tabla 14. Condiciones de la PCR durante la optimización.

Locus Microsatélite	Colorante / Color	Condiciones de la Reacción PCR	Ciclos de PCR
LCA 19	FAM/AZUL	25 – 50 ng de ADN, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl), 2.0 mM MgCl2, 5 pmol de cada cebador F y R (MWG) y 0.5 U Taq ADN polimerasa® (INVITROGEN)	Los ciclos de la PCR fueron los siguientes: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 90 segundos; con una extensión final de 72°C por 10 minutos
YWLL46	HEX/AMARILLO	25 – 50 ng de ADN, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl), 3.0 mM MgCl2, 5 pmol de cada cebador F y R (MWG) y 0.5 U Taq ADN polimerasa® (INVITROGEN)	1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos; con una extensión final de 72°C por 45 minutos.
YWLL40	TET/VERDE	25 – 50 ng de ADN, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl), 3.0 mM MgCl2, 5 pmol de cada cebador F y R (MWG) y 0.5 U Taq ADN polimerasa® (INVITROGEN)	1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 90 segundos; con una extensión final de 72°C por 10 minutos.
YWLL29	FAM/AZUL	25 – 50 ng de ADN, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl), 2.0 mM MgCl2, 5 pmol de cada cebador F y R (MWG) y 0.5 U Taq ADN polimerasa® (INVITROGEN)	1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 90 segundos; con una extensión final de 72°C por 10 minutos.
LCA22	FAM/AZUL	25 – 50 ng de ADN, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl), 2.0 mM MgCl2, 5 pmol de cada cebador F y R (MWG) y 0.5 U Taq ADN polimerasa® (INVITROGEN)	1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos; con una extensión final de 72°C por 45 minutos.

Tabla 14. Condiciones de la PCR durante la optimización (cont...)

Locus Microsatélite	Colorante / Color	Condiciones de la Reacción PCR	Ciclos de PCR
LCA 23	TET/VERDE	25 – 50 ng de ADN, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl), 2.0 mM MgCl2, 5 pmol de cada cebador F y R (MWG) y 0.5 U Taq ADN polimerasa® (INVITROGEN)	1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos; con una extensión final de 72°C por 45 minutos.
YWLL36	HEX/AMARILLO	25 – 50 ng de ADN, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl), 2.0 mM MgCl2, 5 pmol de cada cebador F y R (MWG) y 0.5 U Taq ADN polimerasa® (INVITROGEN)	1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos; con una extensión final de 72°C por 45 minutos.
YWLL08	FAM/AZUL	25 – 50 ng de ADN, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl), 2.0 mM MgCl2, 5 pmol de cada cebador y 0.5 U Taq ADN polimerasa® (INVITROGEN)	1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos; con una extensión final de 72°C por 45 minutos.
YWLL43	HEX/AMARILLO	25 – 50 ng de ADN, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl), 2.0 mM MgCl2, 5 pmol de cada cebador F y R (MWG) y 0.5 U Taq ADN polimerasa® (INVITROGEN)	1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos; con una extensión final de 72°C por 45 minutos.
LCA 5	HEX/AMARILLO	25 – 50 ng de ADN, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 1X PCR buffer (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl), 2.0 mM MgCl2, 5 pmol de cada cebador F y R (MWG) y 0.5 U Taq ADN polimerasa® (INVITROGEN)	1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos; con una extensión final de 72°C por 45 minutos.

Tabla 15. Rango de tamaño de los patrones alélicos

Locus Microsatélite	Colorante / Color	Rango de Alelos (bp)
LCA 19	FAM /AZUL	81-110
YWLL46	HEX /AMARILLO	95-109
YWLL40	TET / VERDE	180-188
YWLL29	FAM /AZUL	214-222
LCA22	FAM /AZUL	111-115
LCA 23	TET / VERDE	136-148
YWLL36	HEX /AMARILLO	149-177
YWLL08	FAM /AZUL	130-180
YWLL43	HEX /AMARILLO	132-150
LCA 5	HEX /AMARILLO	186-204

Tabla 16. Condiciones de las reacciones de PCR múltiples.

PCR Múltiple	Locus Microsatélite	Colorante / Color	Rango de Alelos (bp)	Condiciones de la Reacción PCR	Ciclos de PCR
1	LCA 19	FAM/AZUL	84-118	25 – 50 ng ADN 2mM Cebador F 2mM Cebador R QIAGEN Multiplex Kit Master Mix incluye: HotStar Taq® ADN polimerasa Buffer PCR Multiplex 3.0 mM $MgCl_2$ 0.2 mM dNTPs	1 ciclo de 95°C por 15 minutos; 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 90 segundos y 72°C por 60 segundos; con una extensión final de 60°C por 30 minutos.
	YWLL46	HEX/AMARILLO	98-110		
	YWLL40	TET/VERDE	180-190		
	YWLL29	FAM/AZUL	218-232		
2	LCA22	FAM/AZUL	114-120		1 ciclo de 95°C por 15 minutos; 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 90 segundos y 72°C por 60 segundos; con una extensión final de 60°C por 30 minutos.
	LCA 23	TET/VERDE	131-159		
	YWLL36	HEX/AMARILLO	148-166		
3	YWLL08	FAM/AZUL	135-177		
	YWLL43	HEX/AMARILLO	131-157		
	LCA 5	HEX/AMARILLO	180-204		

Los productos de PCR fueron diluidos a razón de 1:5 en una mezcla de Formamida (AMRESCO), Genescan-350 TAMRA® (ABI Prism) y ABI Genescan Loading Buffer® (ABI Prism) (5:1:1). Las muestras de PCR diluidas fueron desnaturalizadas por 2 minutos a 95°C y luego colocadas sobre hielo. Todos los productos de PCR fueron separados en un gel de poliacrilamida al 4.25 %, Gene Page® (AMRESCO) por 1 hora y 42 minutos, a 1000 V, 21.9 mAmp, 22W y a una temperatura del gel de 51°C en buffer TBE 1X, utilizando un equipo de secuenciamiento ABI 377 DNA sequencers® (Applied Biosystems).

El análisis de los resultados fue realizado usando el software GeneScan® Analysis version 2.1 (Applied Biosystems) y el tamaño final de los alelos determinado usando el software ABI Genotyper® version 2.5 (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante (PE Applied Biosystem, 1996a; PE Applied Biosystem, 1996b).

2.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un equipo de electroforesis no automatizado (sistema de electroforesis Hoefer)

Se realizó la amplificación del ADN usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando las mismas condiciones y ciclos de temperaturas para cada uno de los locus microsatélite antes descritos, con la única diferencia que no se usaron cebadores marcados con colorantes.

Los productos de PCR fueron diluidos con Loading dye 6X® (Promega) a razon de 5:1 y fueron separados en un gel de poliacrilamida al 8% ACCUGEL® (National diagnostics), durante 8 horas, a 250 V en Solución tampón TBE 1X y a una temperatura del gel de 51°C, utilizando un sistema de electroforesis vertical (Hoeffer) (Streiff *et al.*, 1998).

La visualización de los fragmentos amplificados se realizó usando la técnica de tinción con nitrato de plata (Bassam *et al.*, 1991).

El análisis de los resultados se realizó por simple observación de las bandas en el gel, con la ayuda de los patrones alélicos (muestras con distintos rangos de tamaño de alelos para cada locus microsatélite).

2.2 Análisis estadístico

2.2.1 Determinación de Paternidad

La asignación de paternidad fue dada por exclusión, observando incompatibilidades entre los tamaños de alelos del padre, de la madre y de la(s) cría(s). Las crías tienen que compartir un tamaño de alelo de cada locus con la madre (genotipo maternal) y el otro tamaño de alelo con el putativo padre (genotipo paternal). Los tamaños de alelos fueron determinados usando el software ABI Genotyper® version 2.1 (Applied Biosystems) y por comparación con patrones alélicos en los geles teñidos con nitrato de plata.

Se estableció el poder de la prueba de parentesco empleando la medición de la **Probabilidad de exclusión** individual para cada sistema de marcador microsatélite y acumulada para todos los sistemas de marcadores microsatélites utilizados.

La **Probabilidad de exclusión** tanto individual como acumulada fue determinada en base a las frecuencias alélicas, utilizando las fórmulas descritas por Jamieson & Taylor (1997). Es necesario resaltar que otros autores (Sarno *et al.*, 2001; Mommens *et al.*, 1998; Kankan & Fado, 1999) han usado estas formulas para la determinación de la **Probabilidad de exclusión** tanto individual como acumulada en estudios de variabilidad genética y de asignación de paternidad.

2.2.2 Probabilidad de exclusión para un locus microsatélite

Se determinó la **Probabilidad de exclusión** mediante la formula de exclusión general para "n" alelos, cuando se dispone de los genotipos del padre, madre y cría descrita por Jamieson & Taylor (1997).

La formula es expresada en función de probabilidades alélicas para un locus (p_i):

$$P = 1 - 2\sum_{i=1}^{n} p_i^2 + \sum_{i=1}^{n} p_i^3 + 2\sum_{i=1}^{n} p_i^4 - 3\sum_{i=1}^{n} p_i^5 - 2\left(\sum_{i=1}^{n} p_i^2\right)^2 + 3\sum_{i=1}^{n} p_i^2 \sum_{i=1}^{n} p_i^3$$

P = Probabilidad de exclusión

p_i = Probabilidades alélicas

2.2.3 Probabilidad de exclusión acumulada para los 10 loci microsatélites

Se determinó la **Probabilidad de exclusión** acumulada para los 10 loci microsatélites analizados mediante la formula descrita por Jamieson & Taylor (1997).

$$P = 1 - (1 - P_1)(1 - P_2)(1 - P_3) \ldots (1 - P_k)$$

Donde: P = Probabilidad de exclusión acumulada

P_1, P_2, P_3, P_k = Probabilidades de Exclusión de cada locus microsatélite

2.3 Uso de software estadístico.

Para la determinación de la probabilidad de exclusión y el análisis de parentesco de los animales además se utilizó el software Cervus 2.0 Parentage análisis © Tristan 1998-2001.

IV.- RESULTADOS

En base al análisis de 47 alpacas de la provincia de Canchis – Cusco, se determinaron las frecuencias alélicas, el número de alelos, el rango de tamaño de los alelos y la probabilidad de exclusión para cada uno de los 10 loci microsatélites utilizados en el estudio y son detallados en la Tabla 17.

Se observó en los 10 microsatélites analizados polimorfismo, con un número de alelos que varió entre 4 para el locus LCA 22, YWLL 46 y 20 para el locus YWLL08, con un promedio de 9.1 alelos por locus. La probabilidad de exclusión hallada para cada loci microsatélite, varió entre 0.174 para el YWLL 46 y 0.844 para el YWLL 08, con una probabilidad acumulada para los 10 microsatélites de 0.9999.

La probabilidad de exclusión acumulada para los 10 loci y para las 3 PCR múltiple son detallados en la Tabla 18.

Las tres reacciones PCR múltiple obtuvieron una elevada probabilidad de exclusión combinada (mayor a 0.90). Se encontró un 22% (4 casos) de error en la asignación de paternidad en los registros de la Estación Experimental IVITA – Maranganí.

Fue posible resolver la paternidad en 17 de los 18 casos por medio de comparación entre los tamaños de alelos entre padres, madres y crías y por uso del software Cervus 2.0. Parentage análisis © 1998-2001 (Tabla 19). Los resultados del genotipado de cada individuo (padres, madres y crías) se detallan en la Tabla 20.

Tabla 17. Número de alelos, tamaño de alelos, frecuencia alélica y probabilidad de exclusión para cada uno de los 10 microsatélites analizados.

Microsatélite	Número de Alelos	Tamaño de los alelos	Alelos	Frecuencia	PE*
LCA 19			85	0.1170	
			89	0.0213	
			91	0.0106	
			93	0.0319	
			95	0.0213	
			99	0.1277	
			101	0.4787	
			103	0.0638	
			105	0.0319	
			107	0.0213	
			111	0.0638	
	12	85 – 117	117	0.0106	0.548
YWLL 29			214	0.0957	
			216	0.2128	
			218	0.0957	
			220	0.3191	
			222	0.0745	
			224	0.1277	
			226	0.0532	
			228	0.0106	
	9	214 – 234	234	0.0106	0.634
YWLL 40			180	0.2340	
			182	0.0106	
			184	0.0957	
			186	0.1489	
	5	180 – 188	188	0.5106	0.408
YWLL 46			97	0.8085	
			103	0.0106	
			105	0.0745	
	4	97 – 109	109	0.1064	0.174
YWLL 43			128	0.0326	
			138	0.0109	
			142	0.2826	
			144	0.0761	
			146	0.4674	
			148	0.0217	
			150	0.0978	
	8	128 - 156	156	0.0109	0.452

Tabla 17. Número de alelos, tamaño de alelos, frecuencia alélica y probabilidad de exclusión para cada uno de los 10 microsatélites analizados (Cont…)

Microsatélite	Número de Alelos	Tamaño de los alelos	Alelos	Frecuencia	PE*
LCA 5			188	0.2021	
			190	0.0851	
			192	0.0957	
			194	0.0638	
			202	0.3617	
			204	0.1809	
	7	188 – 206	206	0.0106	0.575
YWLL 08			134	0.1489	
			138	0.0106	
			140	0.0638	
			142	0.0532	
			148	0.0426	
			150	0.1170	
			152	0.0745	
			154	0.0319	
			156	0.0532	
			158	0.0319	
			162	0.0106	
			166	0.0745	
			168	0.0319	
			170	0.0426	
			176	0.0745	
			178	0.0851	
			180	0.0106	
			182	0.0213	
			184	0.0106	
	20	134 – 186	186	0.0106	0.844
LCA 23			132	0.0106	
			136	0.0851	
			138	0.0532	
			142	0.2128	
			144	0.0106	
			146	0.2447	
			148	0.2660	
			149	0.0106	
			156	0.0106	
			158	0.0106	
	11	132 – 160	160	0.0851	0.621

Tabla 17. Número de alelos, tamaño de alelos, frecuencia alélica y probabilidad de exclusión para cada uno de los 10 microsatélites analizados (Cont…)

Microsatélite	Número de Alelos	Tamaño de los alelos	Alelos	Frecuencia	PE*
LCA 22			113	0.6383	
			115	0.2340	
			117	0.0532	
	4	113 – 119	119	0.0745	0.294
YWLL 36			149	0.2340	
			151	0.1277	
			153	0.0638	
			157	0.1596	
			159	0.0745	
			165	0.0851	
			169	0.0532	
			171	0.0319	
			173	0.0213	
			175	0.1277	
	11	149 – 179	179	0.0213	0.733

* PE Probabilidad de exclusión.

Tabla 18. Probabilidad de exclusión de los diferentes microsatélites usados en alpacas.

Múltiple	Microsatélites	PE*	PE acum**
M 1	LCA 19	0.548	
	YWLL 29	0.634	
	YWLL 40	0.408	
	YWLL 46	0.174	0.9191
M 2	LCA 23	0.621	
	LCA 22	0.294	
	YWLL 36	0.733	0.9286
M 3	YWLL 43	0.452	
	LCA 5	0.575	
	YWLL 08	0.844	0.9637
M1 + M2 + M3	10 Microsatélites		0.9999

* PE. Probabilidad de exclusión.
** PE acum. Probabilidad de exclusión acumulada.

Tabla 19. Resultados del genotipado de las alpacas de IVITA – Maranganí.

Código	Condición	LCA19		YWLL29		YWLL40		YWLL46		YWLL43		LCA5		YWLL08		LCA23		LCA22		YWLL36	
1348	Padre	101	101	214	220	180	188	97	97	148	148	202	204	148	185	148	156	113	119	153	169
1349	Padre	89	101	220	220	184	188	97	97	146	146	190	204	142	170	142	149	113	113	157	165
1350	Padre	85	101	218	220	184	188	97	97	146	146	188	202	142	154	148	148	113	115	151	175
1351	Padre	101	101	220	222	180	180	97	97	142	142	204	204	148	150	142	146	113	119	149	157
1374	Padre	85	101	218	220	186	188	97	105	144	144	202	204	150	162	142	148	113	115	149	153
1379	Padre	99	101	216	220	188	188	97	105	150	150	192	202	166	178	138	160	113	113	151	157
1380	Padre	101	105	216	216	188	188	97	109	144	144	194	204	148	152	136	136	113	113	149	151
1383	Padre	101	103	224	224	180	188	97	103	146	146	190	202	134	182	148	148	113	115	151	175
1385	Padre	85	101	218	220	188	188	97	97	146	146	192	194	134	140	146	146	113	113	149	173
1377	Padre	91	105	216	220	188	188	97	97	146	146	202	206	140	176	148	148	113	115	151	169
1386	Padre	85	101	216	220	186	186	97	97	142	142	188	202	138	166	146	148	113	115	153	165
1352	Madre	93	103	220	226	184	186	97	105	142	146	188	190	152	176	146	148	113	113	149	159
1353	Madre	99	101	216	220	184	188	97	97	142	142	202	204	168	168	138	158	113	115	159	175
1354	Madre	99	103	220	224	184	186	97	97	146	146	190	192	134	152	146	148	113	113	149	175
1355	Madre	99	117	214	220	180	186	97	105	138	156	202	204	152	154	146	146	113	113	175	175
1389	Madre	85	101	220	226	180	186	97	97	146	150	194	202	156	180	160	160	113	113	159	165
1401	Madre	93	111	216	220	180	188	97	105	146	146	188	204	176	178	142	160	113	113	149	149
1402	Madre	101	101	216	216	180	188	97	97	146	146	188	202	150	150	146	146	113	117	149	165
1403	Madre	99	101	216	220	188	188	97	105	146	146	194	202	142	158	142	142	113	113	151	169
1407	Madre	101	101	216	222	180	188	97	109	142	144	188	188	150	166	142	142	115	119	165	169
1408	Madre	101	111	214	220	180	188	97	97	142	146	192	202	178	178	144	148	113	119	149	157
1411	Madre	95	101	214	216	182	188	97	97	142	146	202	202	140	156	136	148	113	115	157	171
1388	Madre	99	103	220	224	184	186	97	97	146	146	190	192	134	152	146	148	113	113	149	175

Tabla 19. Resultados del genotipado de las alpacas de IVITA – Maranganí (Cont...)

Código	Condición	LCA19		YWLL29		YWLL40		YWLL46		YWLL43		LCA5		YWLL08		LCA23		LCA22		YWLL36	
1391	Madre	101	101	220	222	180	180	97	97	142	142	188	204	150	166	142	142	117	119	157	171
1392	Madre	101	101	222	224	188	188	97	109	142	142	188	188	134	182	142	146	113	117	153	157
1393	Madre	89	101	220	224	188	188	97	109	142	150	188	204	134	170	138	146	115	115	149	175
1395	Madre	101	111	214	224	188	188	97	109	128	142	188	202	140	152	146	160	113	115	149	151
1399	Madre	101	101	214	218	188	188	97	97	146	150	188	188	176	178	136	136	113	115	157	179
1406	Madre	101	101	220	228	186	186	97	97	142	146	202	202	140	158	142	160	115	115	149	157
1356	Cría	85	99	220	226	186	188	97	97	146	146	190	192	134	142	146	146	113	113	149	149
1357	Cría	101	103	220	226	186	188	97	97	146	146	190	204	170	176	142	146	113	113	157	159
1358	Cría	85	99	218	220	180	188	97	97	146	146	202	204	142	154	146	146	113	113	175	175
1359	Cría	99	101	220	220	180	188	97	97	142	142	202	202	168	184	148	148	113	119	153	159
1416	Cría	85	85	218	220	186	188	97	97	144	150	194	204	150	156	148	148	113	115	149	159
1428	Cría	93	111	214	216	184	188	97	109	146	146	202	204	176	178	142	148	113	113	149	149
1429	Cría	101	105	216	216	188	188	97	109	146	146	194	202	150	152	136	146	113	117	149	151
1430	Cría	101	101	216	216	184	188	97	109	146	146	188	202	158	166	142	148	113	117	165	169
1434	Cría	101	101	222	224	180	188	97	109	144	146	188	190	134	166	142	148	115	115	151	165
1435	Cría	103	111	220	224	180	188	97	97	142	146	202	202	134	178	148	148	113	113	151	157
1438	Cría	95	101	216	218	188	188	97	97	146	146	192	202	134	156	146	148	113	115	171	173
1415	Cría	99	101	216	224	180	184	97	97	146	146	192	202	134	148	142	146	113	113	165	175
1418	Cría	99	101	222	222	180	188	97	105	142	142	202	204	134	150	142	160	113	119	157	159
1419	Cría	99	99	214	224	180	188	97	109	142	142	188	202	134	134	132	142	113	113	153	157
1420	Cría	85	107	214	214	180	188	97	109	146	150	202	204	150	170	138	146	113	115	149	175
1422	Cría	85	111	218	224	180	188	97	97	128	128	202	202	140	150	136	148	113	115	151	157
1426	Cría	101	107	216	218	180	188	97	97	150	150	188	192	176	178	136	138	113	113	151	179
1433	Cría	101	101	216	220	184	186	97	97	142	142	188	202	158	166	142	160	115	115	149	157

Tabla 20. Resultados de la prueba de paternidad usando el software Cervus 2.0 Parentage análisis © (1998-2001).

Crías	Loci analizados	Madres	Loci analizado	Errores loci C-M	Probabilidad de exclusión	Candidatos Padres	Errores loci C-P	Confianza	Datos de registro
1356	10	1352	10	2	0.0089470865	**1385**	0	*	ERROR
1357	10	1353	10	3	0.0001413916	**1349**	0	*	ACIERTO
1358	10	1354	10	3	0.0024736470	**1385**	3	*	ERROR
1359	10	1355	10	4	0.0243203454	**1348**	3	*	ERROR
1416	10	1389	10	1	0.0000533562	**1374**	0	*	ACIERTO
1428	10	1401	10	0	0.0005149854	**1377**	2	*	ACIERTO
1429	10	1402	10	0	0.0000016372	**1380**	1	*	ACIERTO
1430	10	1403	10	2	0.0000541923	**1350**	3	*	ACIERTO
1434	10	1407	10	0	0.0002368775	**1383**	0	*	ACIERTO
1435	10	1408	10	0	0.0003903532	**1383**	0	*	ACIERTO
1438	9	1411	10	0	0.0000895693	**1385**	0	*	ACIERTO
1415	10	1388	10	0	0.0002099912	**1348**	4	*	ACIERTO
1418	10	1391	10	0	0.0000060193	**1379**	3	*	ACIERTO
1419	10	1392	10	1	0.0000433061	**1348**	5	*	ACIERTO
1420	**10**	**1393**	**10**	**2**	**0.0100220330**	1348	**6**		**ERROR**
1422	10	1395	10	1	0.0000387102	**1374**	2	*	ACIERTO
1426	10	1399	10	0	0.0000013663	**1379**	0	*	ACIERTO
1433	10	1406	10	0	0.0001629944	**1386**	2	*	ACIERTO

Celdas sombreadas pertenecen al único animal que no se pudo cotejar la paternidad debido a que el verdadero padre no se encontraba en las muestras analizadas.

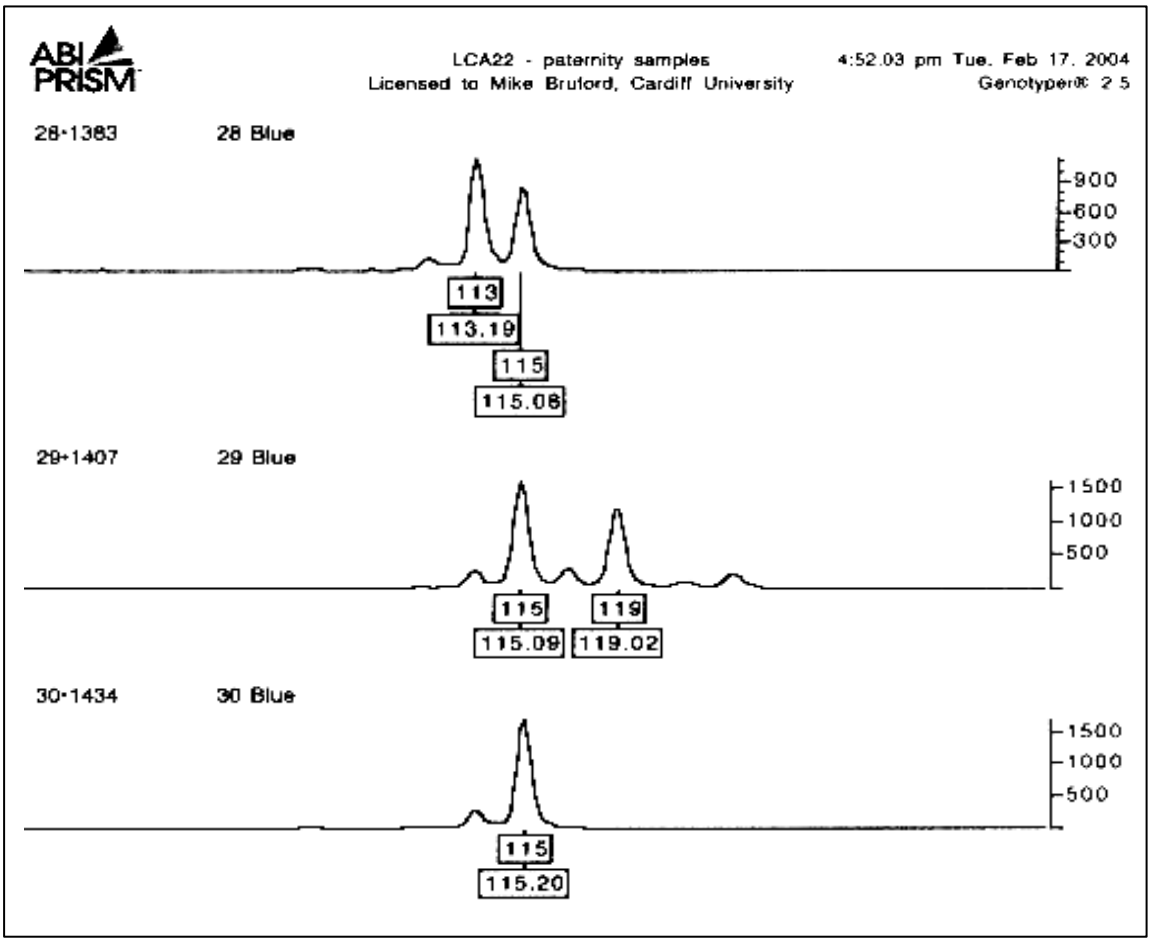


Figura 5. Lectura del locus LCA 22 utilizando los software GeneScan 2.1 y Genotyper 2.5 (ABI PRISM).

Lectura del locus LCA 22 marcado con el colorante FAM (azul). Los números 28, 29 y 30 corresponden a las muestras 1383 (Padre), 1407 (Madre) y 1434 (Cría); nótese que la cría (homocigoto para el alelo 115) comparte un alelo con el padre y otro con la madre. A la derecha se observa el rango de intensidad de fluorescencia.

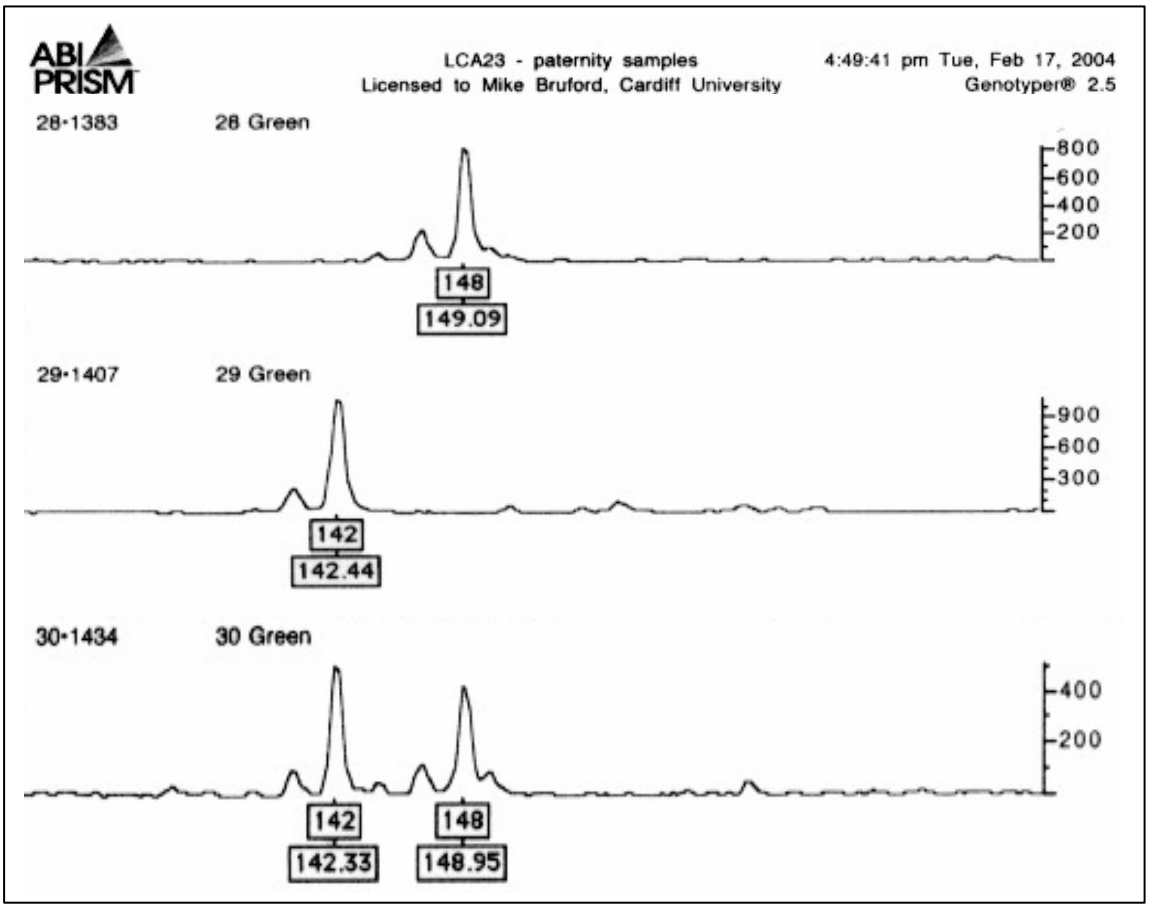


Figura 6. Lectura del locus LCA 23 utilizando los software GeneScan 2.1 y Genotyper 2.5 (ABI PRISM).

Lectura del locus LCA 23 marcado con el colorante TET (verde). Los números 28, 29 y 30 corresponden a las muestras 1383 (Padre), 1407 (Madre) y 1434 (Cría); nótese que la cría (heterocigoto para el alelo 142 y 148) comparte un alelo con el padre (148) y otro con la madre (142). A la derecha se observa el rango de intensidad de fluorescencia.

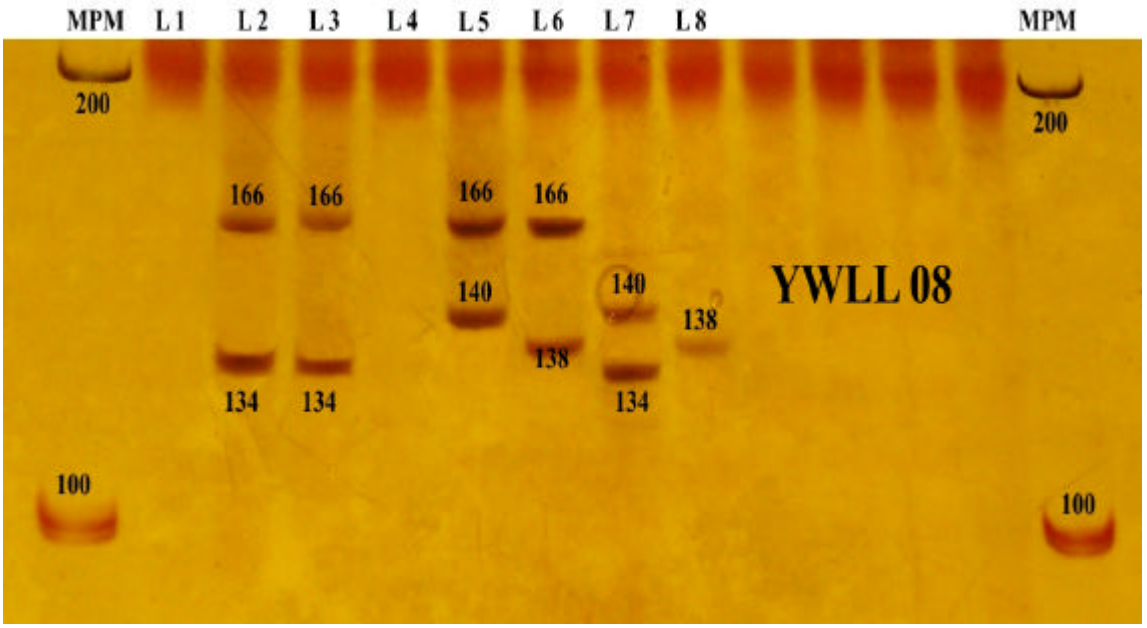


Figura 7. Lectura del locus YWLL 08 utilizando técnica de tinción con nitrato de plata (Uso de PCR simple).

Lectura del locus YWLL 08 utilizando la técnica de tinción con nitrato de plata para la obtención de patrones alélicos. MPM = Marcador de Peso Molecular ***(Eco1471/PvuI)*** L1 = Blanco, L2 =Patrón alelos 134 y 166, L3 = Alegado Padre 2, L4 = Blanco, L5 = Cría, L6 = Madre, L7 = Verdadero Padre y L8 = Patrón alelo 138.

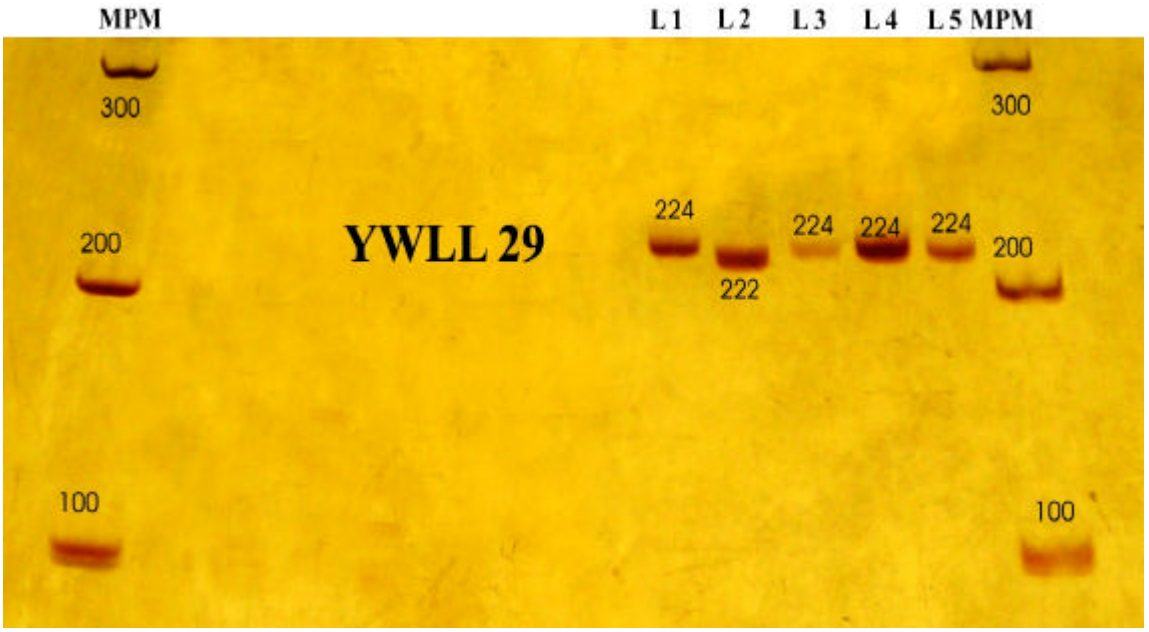


Figura 8. Lectura del locus YWLL 29 utilizando técnica de tinción con nitrato de plata (Uso de PCR simple).

Lectura del locus YWLL 29 utilizando la técnica de tinción con nitrato de plata. MPM = Marcador de Peso Molecular **(*Eco1471/PvuI*)** L1 = Padre 1, L2 = Padre 2, L3 = Madre, L4 = Cría y L5 = Patrón 224.

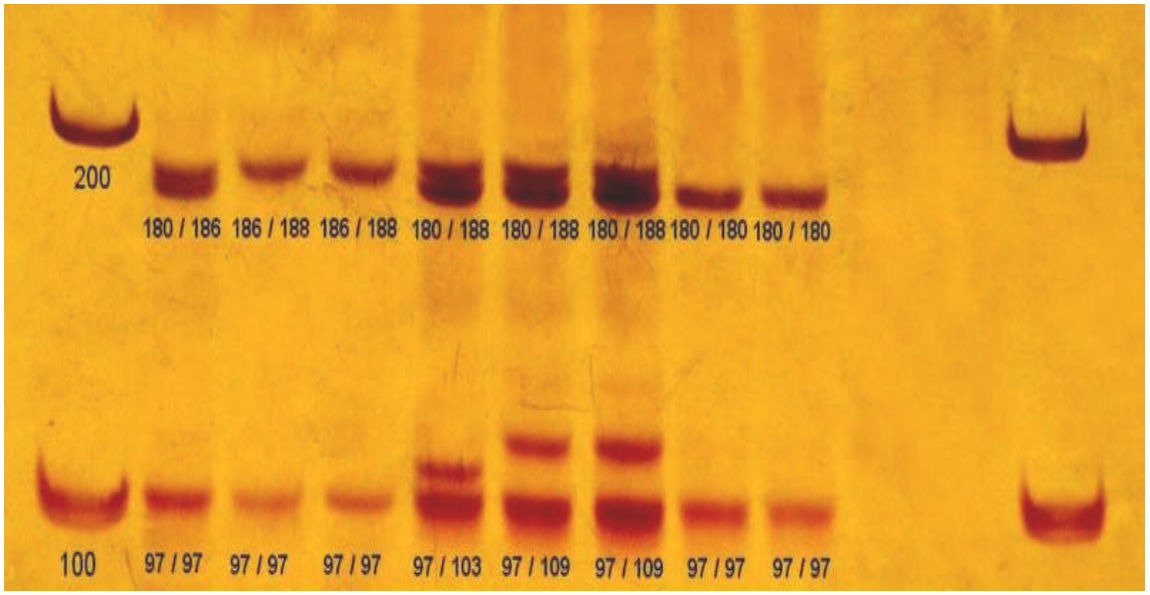


Figura 9. Lectura de los loci YWLL 40 e YWLL 46 utilizando técnica de tinción con nitrato de plata (Uso de PCR múltiple).

Lectura del locus YWLL 40 (Arriba) y YWLL 46 (Abajo) utilizando la técnica de tinción con nitrato de plata. MPM = Marcador de Peso Molecular **(*Eco1471/PvuI*)** L1 a L7 = Muestras alpacas Canchas y L8 = Patrón alelo 180 y alelo 97 para los loci YWLL 40 y 46 respectivamente.

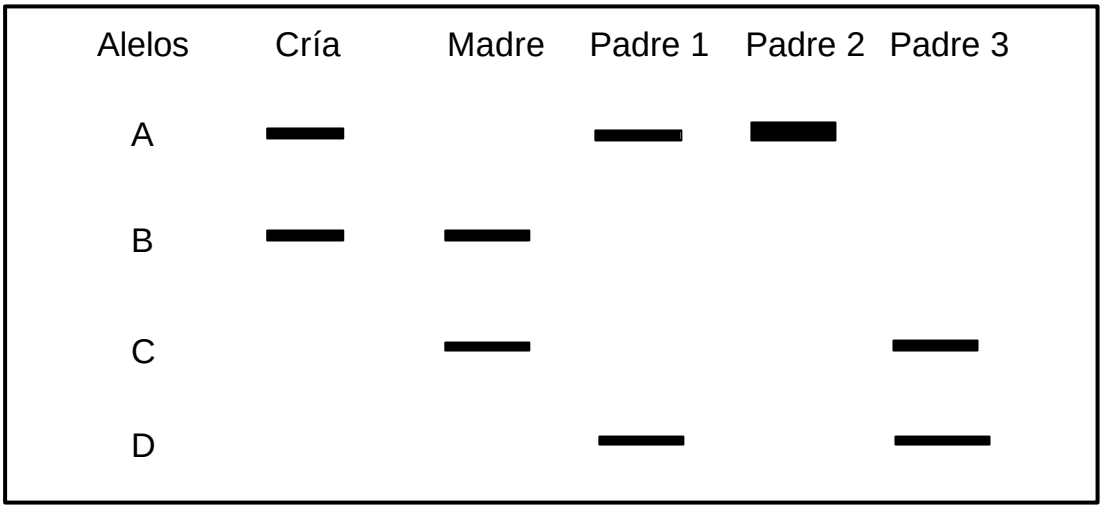


Figura 10. Diagrama método de determinación de parentesco.

En la figura se aprecia los genotipos de la cría, madre y 3 alegados padres. Se presentan 4 tamaños de alelos A, B, C y D y se procede a comparar los genotipos de la cría con los de los alegados padres. Obsérvese que en base a esta grafica podemos excluir solamente al padre 3.

V.- DISCUSIÓN

La determinación de parentesco constituye la piedra angular para la elaboración de libros genealógicos y registros de pedigrí en animales domésticos, haciéndose necesario contar con pruebas cada vez más certeras, que permitan disminuir el porcentaje de error en la asignación de paternidad, ya que esto conlleva a la invalidación de registros.

Con el transcurrir del tiempo, las pruebas de asignación de paternidad se han convertido en un importante tema de estudio, tanto en animales domésticos como en humanos.

Para la determinación de paternidad se cuenta con múltiples técnicas que varían desde estudios de observación hasta pruebas moleculares, dentro de las cuales se incluye el ADN microsatélite. Todas los tipos de pruebas permiten determinar paternidad pero con diferentes % de certeza en los resultados.

Muchos autores han demostrado la factibilidad del uso de microsatélites (6 a 10) para determinación de paternidad en animales domésticos, con probabilidades de exclusión aceptables.

En camélidos del viejo mundo Sasse *et al.* (2000) demostró la factibilidad de realizar pruebas de paternidad en camélidos y Skidmore *et al.* (1999) en un estudio reproductivo utilizó marcadores microsatélites para determinar paternidad de híbridos de camello y guanaco. Además Kadwell *et al.* (2001) determinaron microsatélites que permiten detectar hibridismo entre especies domesticas de camélidos sudamericanos y Sarno *et al.* (2001) demostraron la aplicación de microsatélites en estudios de variabilidad genética

Sin embargo, no existe información sobre pruebas de paternidad y/o parentesco en camélidos sudamericanos y además no se cuenta con un protocolo de laboratorio establecido para dicho fin.

Una limitante en nuestro medio, para el análisis de ADN microsatélite, es la carencia de equipos de análisis automatizados como equipos de secuenciamiento automático (ABI 377 DNA sequencers® Applied Biosystems), los cuales disminuyen el tiempo de análisis y facilitan la interpretación de los resultados, pero estos equipos están limitados a pocas instituciones de investigación privadas debido a su elevado costo, tanto de reactivos como del mantenimiento necesario para su uso, lo cual limita la aplicación de dicha tecnología masivamente en nuestro país.

Por lo que, el objetivo principal del trabajo fue demostrar la factibilidad de realizar pruebas de paternidad y/o parentesco por medio del análisis de microsatélites aplicando una metodología independiente del uso de equipos de secuenciamiento (tinción con nitrato de plata); así como, encontrar los loci microsatélites mas informativos para dicho fin.

En el estudio se usaron dos metodologías de análisis de microsatélite, utilizando un equipo de secuenciamiento automático (ABI 377 DNA sequencers® Applied Biosystems) y la técnica de tinción con nitrato de plata. En ambas metodologías no hubo problemas en la amplificación de los 10 microsatélites estudiados, así como el tamaño de los alelos se encontraron dentro de los rangos publicados por Lang *et al.* (1996) y Penedo *et al.* (1998) a excepción de ligeras variaciones en el YWLL 08 y el YWLL 36, lo cual es posible debido a que los animales utilizados en los estudios de Lang *et al.* (1996) y Penedo *et al.* (1998) no pertenecen a la misma localidad que los animales utilizados en este estudio.

La probabilidad de exclusión hallada para cada loci microsatélite varió considerablemente en los microsatélites YWLL 29, YWLL 40, YWLL 46, YWLL 08 y YWLL 36 (diferencia mayor o menor al 0.1) para la población de la provincia de Canchis (Cusco – Perú) con respecto a lo publicado por Lang *et al.* (1996) y Penedo *et al.* (1998).

Durante el análisis se encontraron microsatélites altamente informativos basados en su alta probabilidad de exclusión (YWLL08, YWLL 36, LCA 23 y YWLL 29), es necesario aclarar que las frecuencias alélicas y las probabilidades de exclusión halladas sólo son válidas para la población de alpacas de la provincia de Canchis (Cusco – Perú).

Se encontró alrededor de un 22% (4 casos) de error en la asignación de paternidad en los animales registrados en la Estación Experimental IVITA - Maranganí, por dicho motivo solo fue posible resolver 17 de los 18 casos de parentesco (94%), debido a la ausencia del verdadero padre en este caso no resuelto.

Se obtuvo los mismos resultados usando un equipo de secuenciamiento ABI 377 DNA sequencers® (Applied Biosystems), los software GeneScan® Analysis versión 2.1 (Applied Biosystems) y ABI Genotyper® versión 2.5 (Applied Biosystems) y con la metodología de tinción con nitrato de plata con el uso de patrones alélicos. La técnica de tinción con nitrato de plata tiene una limitante, la de analizar un solo locus por reacción de PCR, lo cual hace largo y tedioso el análisis de 10 loci por animal. Es necesario acotar, que se observó la factibilidad del uso de PCR múltiple (más de un locus por reacción de PCR) en geles teñidos con nitrato de plata, para loci microsatélites con grandes diferencias en los rangos de tamaño de sus alelos, lo cual permitiría disminuir el tiempo y los costos de la prueba.

Este es el primer estudio diseñado en el país para pruebas de parentesco. La técnica, si bien es cierto, fue ejecutada en alpacas es posible extrapolarla y ser utilizada en llamas y camélidos silvestres, además puede establecerse como uso rutinario en laboratorios peruanos, debido a que no depende de equipos de secuenciamiento automático y de metodologías complejas y costosas.

VI.- CONCLUSIONES

1. Se demostró la factibilidad del uso de ADN microsatélite (10 microsatélites) para la determinación de parentesco con una elevada probabilidad de exclusión (0.9999).

2. Con el uso de tan solo 3 microsatélites (YWLL 43, LCA 5 y YWLL 08) en una reacción de PCR múltiple es posible determinar parentesco con una probabilidad de exclusión aceptable (0.9637).

3. Es posible extrapolar los resultados obtenidos mediante el uso de un equipo de secuenciamiento automático (ABI 377 DNA sequencers® Applied Biosystems) con la metodología de tinción de plata con la diferencia del uso de un solo locus por reacción de PCR.

VII.- LITERATURA CITADA

1. Aert R, Voet M, Van Campenhout S, Vander Stappen J, Volckaert G. 1998. Polymerase chain reaction. In Molecular tools for screening biodiversity Plants and animals. Edit. Karp, A Isaac P, Ingram D. Chapman & Hall. London:111-118.
2. Aranguren-Mendez J. Jordana J. 2001. Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción. Memorias Asociación Venezolana de Producción Animal (AVPA).
3. Areshchenkova T. 2000. Isolation, characterization and mapping of microsatellites from the tomato genome and their application in molecular analysis of centromeric regions. Tesis Ph D. University Halle-Wittenberg. Germany.88.
4. Armor J et al. 1991. Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. In: Microsatellites. Evolution and applications. Ed. Goldstein D, Schlötterer C. Oxford University Press. London:24-33.
5. Barber L. 2001. Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE). NHCTC. Disponible: http://biotech.tec.nh.us/BT210/tutorial10.html
6. Barendse W, Fries R. 1999. Genetic linkage mapping, the gene maps of cattle and the list of loci. In: The genetics of cattle. Ed. R. Fries & A. Ruvinsky. CABI Publishing. London: 329-360
7. Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. Ann. Biochem., 19:680-683.
8. Becerra V. Paredes M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Rev. Agricultura técnica, 60 (3):270-281.
9. Berger SL, Kimmel AR. 1987. Guide Molecular cloning techniques. Academic Press Inc. NY.812 .

10. Bernoco D, Oliveira D, Kuabara M. 1997. Análise de parentesco em cavalos de grupos sanguíneos e polimorfismos bioquimicos á tipagem por DNA. Rev. Bras. Reprod. Anim., 21(4): 38-44.
11. Binns M, Swinburne J, Breen M. 2000. Molecular genetics of the horse. In The genetics of the horse. Ed. A. Bowling & A. Ruvinsky. CABI Publishing. London:109-121.
12. Brown T. 1994. DNA sequencing. IRL – Oxford University Press. Oxford:101.
13. Brown T. 2000. The polymerase chain reaction. In Essential molecular biology. A practical approach. Ed. T.A. Brown. 2° Ed. Vol 2. Oxford University Press. Oxford:89-120.
14. Canovas F. Galian J. 2002. Aplicación de marcadores ADN (microsatélites) para el estudio de paternidad en Murciano – Granadina. Rev. La Cabra, (3):9-12.
15. Cenis JL. 2000. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. Rev. Terralia, 4 (12): 41-43.
16. Chuang-Dobbs H, Webster M, Colmes R. 2001. Paternity and parental care in the black-throated blue warbler, Dendroica caerulescens. Animal behaviour, 62:83-92.
17. Coltman D, Bancroft D, Robertson A, Smith J, Clutton-Brock T, Pemberton J. 1999. Male reproductive success in a promiscuous mammal: behavioural estimates compared with genetic paternity. Molecular ecology, 8:1199-1209.
18. Constable J, Ashley M, Goodall J, Pusey A. 2001. Noninvasive paternity assignment in Gombe chimpazees. Molecular ecology, 10:1279-1300.
19. Dawid P, Mortera J, Pascali V. 2001. Non-fatherhood or mutation? A probabilistic approach to parental exclusion in paternity testing. Forensic science international, 124:55-61.
20. Eisen J. 1991. Mechanistic basic for microsatellite instability. In Microsatellites. Evolution and applications. Ed. Goldstein D, Schlötterer C. Oxford University Press. Oxford:34-48.
21. Ellegren H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. Trends in genetics, 10(12):552-558
22. Garber RA., Morris JW. 1983. General equation for the average power of exclusion for genetic systems of n codominat alleles in one-parent and in noparent cases of

disputed parentage. In: Inclusion Probabilities in parentage testing. Ed. RH. Walker. American association of Blood banks, Arlington. Virginia:227-280

23. Garcia H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Univ. Diag., 1(2):31-41.
24. Halos S, Chu J, Ferreon A, Magno M. 1999. Philippine population database at nine microsatellite loci for forensic and paternity applications. Forensic Science International, 101:27-32.
25. Hancock J. 1991. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In Microsatellites. Evolution and applications. Ed. Goldstein D, Schlötterer C. Oxford University Press. Oxford:01-09.
26. Hayden M, Sharp P. 2001. Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. Nucleic Acids Research, 29(8):1-6.
27. Henke L, Fimmers R, Josephi E, Cleef S, Dülmer M, Henke J. 1999. Usefulness of conventional blood groups, DNA-minisatellites, and short tandem repeat polymorphisms in paternity testing: a comparison. Forensic Science International. 103, 133-142.
28. Hutton M, Bozzini M, Flickinger G, Giuffra E. 1998. Automated identity and paternity testing in swine. Abstracts of the VI Conference international plant and animal genome. San Diego. EE.UU.
29. Ireland J, Broderick A, Glen F, Godley B, Hays G, Lee P, Skibinski D. 2003. Multiple paternity assessed using microsatellite markers, in green turtles Chelonia mydas (Linnaeus, 1758) of Ascension Island, South Atlantic. Journal of experimental marine biology and ecology, 291:149-160.
30. Jamieson A, Taylor CS. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. Animal Genetics, 28:397-400.
31. Jamieson A. 1965. The genetics of transferrin in cattle. Heredity 20:419-441.
32. Jamieson A. 1966. The application of a blood group formula. In: Polymorphismes Biochemiques des Animaux, pp. 461-464. X° Congrés Européen sur les groupes sanguines et le polymorphisme biochimique des animaux. Institut National de la Recherche Agromomique. Paris.

33. Jobim L, Jobim MR, Gamio F, Ewald G, Jobim M, Fernandes L. 2003. Paternity testing analysis-allelic distribution, heterozygosity and power of exclusion of commonly used SLPs and STRs in the brazilian Caucasoid population. International Congress Series, 1239:213-218.
34. Jones A, Ardren W. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. Molecular ecology, 12:2511-2523.
35. Kadwell M, Fernández M, Stanley H, Baldi R, Wheeler J, Rosadio R, Bruford M. 2001. Genetic analysis reveal the wild ancestors of the llama and the alpaca. Proc R. Soc. Lond. B., 268: 2575—2584.
36. Kankan D, Fado M. 1999. Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite análisis of multiple-sire matings. Animal genetics, 30:355-361.
37. Karcher S. 1995. Molecular biology. A proyect approach. Academic Press. USA:45-134 / 215-227.
38. Kenneth J, Neff B, Wright J, Gross M. 1996. DNA fingerprinting of bluegill sunfish (Lepomis macrochirus) using (GT)n microsatellites and its potential for assessment of mating success. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 53:342-349.
39. Lang K. Yang Y, Plante Y. 1996. Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llamas and alpacas. Animal genetics 27: 285-294.
40. Lee H, Lee J, Han G, Hwang J. 2000. Motherless case in paternity testing. Forensic science international, 114:57-65.
41. Linacero R, Rueda J, Vazquez A. 1998. Quantification of DNA. In Molecular tools for screening biodiversity Plants and animals. Ed. Karp, A Isaac P, Ingram D. Chapman & Hall. London:18-22.
42. Maniatis T, Fritsch J, Sambrook J. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. NY:100-200.
43. Mommens G, Van Zeveren A, Peelman L. 1998. Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity cases in American bison, Bison bison L. Animal genetics, 29:12-18.

44. Morera L. De Andrés DF, Barbancho M, Garrido JJ, Barba CJ. 1999. Detección de variabilidad genética por microsatélites en el Alano Español Archivos de Zootecnia, 48:63-70.
45. Mueller U, LaReesa Wolfenbarger L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. TREE, 14(10):389-394.
46. Pádár Z, Egyed B, Kontadakis K, Zöldág L, Fekete S. 2001. Resolution of parentage in dogs by examination of microsatellites after death of putative sire: case report. Acta Veterinaria Hungarita, 49(3):269–273.
47. PE Applied Biosystem. 1996a. ABI PRISM™ GeneScan® Analysis 2.1 User's manual. Perkin-Elmer Corporation.
48. PE Applied Biosystem. 1996b. ABI PRISM™ Genotyper® 2.0 User's manual. Perkin-Elmer Corporation.
49. Penedo C, Caetano R, Cordova I. 1998. Microsatellite markers for South american camelids. Animal Genetics, 29:398-413.
50. Penedo MC. 1996. Bloodtyping and DNA fingerprint applied to the stablishment of pedigrees in alpacas. The alpaca registry journal, 1(1):5.
Disponible: www.alpacaregistry.net/journal/win96j-9.html
51. QIAGEN. 2002. QIAGEN® Multiplex PCR Handbook. For fast and efficient multiplex PCR. QIAGEN:12-14.
52. Robinson D, Lafleche G. 2000. Nucleic Acid electrophoresis in agarose gels.In Essential molecular biology. A practical approach. Ed. T. Brown. Vol 1. 2° Ed. Oxford University Press. Oxford: 89-120.
53. San Primitivo F. 2001. La mejora genética animal en la segunda mitad del siglo XX. Archivos de Zootecnia, 50 (192):522-523.
54. Sandberg K, Cothran E. 2000. Blood groups and biochemical polymorphisms. In The genetics of the horse. Ed. A. Bowling & A. Ruvinsky. CABI Publishing. London:98.
55. Sarno R, Franklin W, O'Brien S, Jonson W. 2001. Patterns of mtDNA and microsatellite variation in a island and mainland population of guancos in southern Chile. Animal conservation. The zoological society of London, 4:93-101.

56. Sasse J, Mariasegaram M, Jahabar Ali M, Pullenayegum S. Babu R, Kinne J, Wernery U. 2000. Development of a microsatellite parentage and identity verification test for dromedary racing camels. Abstracts of the 27th Conference of the international society of animal genetics (ISAG). Mineappolis. EE.UU.
57. Sawaguchi A, Wang, X, Sawaguchi T. 2003. A critical review for DNA polymorphic markers and blood group markers in paternity testing. International Congress Series 1239, 749-753.
58. Schlötterer C, Harr B. Microsatellite Instability. 2001. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group:1-4.
59. Sealey P, Southern E. 1982. Gel electrophoresis of DNA. In: Gel Electrophoresis of nucleic acids a practical approach. Ed. Rickwood D, Hames B. IRL Press. Oxford:39-76.
60. Shinde D, Lai Y, Sun F, Arnheim N. 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured bu ¨CR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)n and (A/T)n microsatellites. Nucleic Acids Research, 31(3):974-980.
61. Sirchia S, Garagiola I, de Andreis C, Gasoil I, Gramegna M, Colucci G. 1996. Characterization of four microsatellites in an Italian population and their application to paternity testing. Molecular and cellular probes. Academic Press limited, 10:155-158.
62. Skidmore J, Billah M, Binns M, Short R, Allen W. 1999. Hibridizing old and new world camelids: Camelus dromedaries x Lama guanicoe. Proc. R. Soc. Lond. B, 266:649-656.
63. Stracham T, Read A.1999. Human molecular genetics 2. BIOS Scientific Publishers Ltd.
Disponible: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books
64. Streiff R, Labbe T, Bacilieri R, Steinkellner H, Glössl J, Kremer A. 1998. Within-population genetic structure in Quercus robur L. and Quercus petraea (Matt.). Liebl. Assessed with isozymes and microsatellites. Mol. Ecol, 7:317-328.
65. Sunnucks P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. TREE, 15(5):199-203.

66. Thompson J, Pilotti V, Stevens P, Ayres K, Debenham P. 1999. Validation of short tandem repeat analysis for the investigation of cases of disputed paternity. Forensic science international. 100:1-16.
67. Thomson G, Esposito M. 1999. The genetics of complex diseases. Trends in genetics. Millenium issue, 15(12):17-20.
68. Vega-Pla JL. De Andres DF. Garrido JJ. Dorado G. 1998. Propuesta de metodología para la localización de microsatélites en el genoma equino. Arch. Zootec., 48:189-194.
69. Vigilant L, Hofreiter M, Siedel H, Boesch C. 2001. Paternity and relatedness in wild chimpanzee communities. PNAS, 98(23): 12890-12895.
Disponible: www.pnas.org
70. Zhang D, Hewitt G. 1998. Isolation of animal cellular total DNA. In Molecular tools for screening biodiversity Plants and animals. Ed. Karp, A Isaac P, Ingram D. Chapman & Hall. London:5-9.