

ADN y dopaje en equinos

Escriben: Díaz S, Zappa ME, Carino MH, Villegas Castagnasso EE, Lopez RA, Sadaba SA, Corbi Botto CM, Posik DM, Giovambattista G, Peral García P.

Dirección de los autores: Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout" (IGEVET), Centro Científico Tecnológico La Plata (CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Av 60 y 118 S/N, CC296, CP1900, La Plata, Argentina.

El dopaje positivo en equinos puede ser altamente controvertido por los intereses en juego cuando aparece un "resultado adverso". En estos casos, además de la cadena de custodia de la muestra, el análisis de ADN a partir de orina es una herramienta metodológica factible y reproducible para demostrar científicamente la identidad del equino cuestionado.

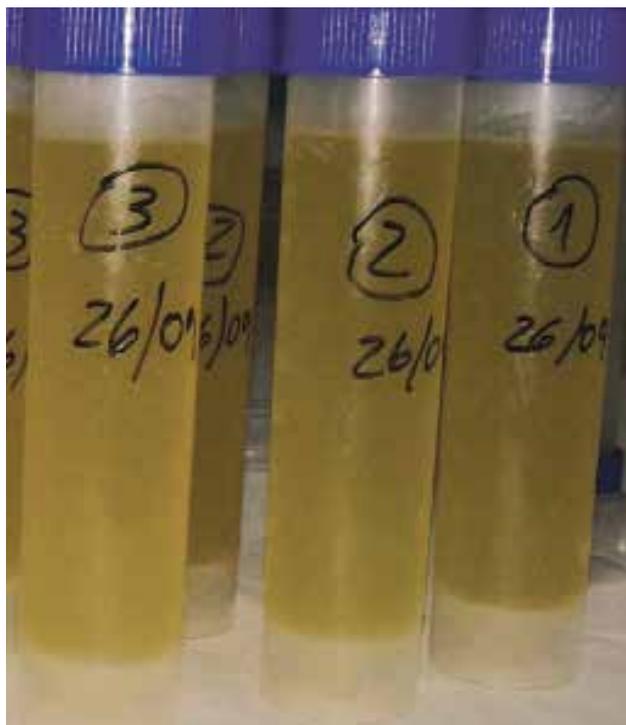


Figura 1: Procesamiento de la orina para extraer ADN a partir de células epiteliales descamadas del tracto urinario. a: La orina es fraccionada para centrifugación;

El término dopaje en caballos de performance se puede definir como "la aplicación ilegal de cualquier sustancia, excepto la dieta normal, que puede modificar las capacidades naturales del caballo al momento de la carrera" (Ungemach 1985), y puede practicarse para incrementar el rendimiento del caballo.

En algunas circunstancias, el origen de las muestras puede ser desafiado a causa de las consecuencias médicas, legales y económicas de un resultado positivo (Thevis y col, 2007).

La bibliografía menciona que los compuestos que se detectan en el análisis son variados, y comprenden medicamentos y drogas utilizados con el fin de obtener una mejora en el resultado deportivo, enmascarar otros compuestos o disminuir el rendimiento del equino. Por ejemplo, en los caballos de deporte, la inoculación de cafeína se considera ilegal.

La cafeína no es parte regular de la dieta del caballo, y se encuentra entre las drogas que pueden ser suministradas para incrementar el rendimiento. Este alcaloide puede obtenerse de los restos del té, café, mate, o puede ser preparado sintéticamente, y su acción puede tener un efecto predominante en el sistema nervioso central o asociarse con respuestas diuréticas. Hay casos en que el dopaje positivo se produce por circunstancias desconocidas y que no tienen que ver con un intento ilegal de mejorar el rendimiento, es decir, es no intencionado o inadvertido, y da un resultado positivo por accidente. Sin embargo, un test positivo es una violación de las reglas antidopaje y consecuentemente es sancionada por las autoridades regulatorias.

A continuación, se presenta una descripción del procedimiento utilizado para el análisis molecular de la muestra de orina y del alcance y utilidad para corroborar la identidad del caballo imputado de dopaje a partir de su ADN.

Utilidad del análisis de ADN en casos de dopaje positivo

El ADN es la molécula que tiene la información genética de cada individuo. El ADN de la orina se origina de la presencia de células epiteliales intactas descamadas del tracto urinario. Sin embargo, solo el 20-30% de las muestras tienen suficiente ADN para obtener resultados periciables.

Además, es necesario separar las células de microorganismos y otros componentes de la orina, antes de la ex-



Figura 1: Procesamiento de la orina para extraer ADN a partir de células epiteliales descamadas del tracto urinario. **b:** Los tubos se centrifugan para obtener un pellet celular;

tracción de ADN, para aumentar las chances de tener un resultado exitoso (Brinkmann y col, 1992).

El perfil de ADN es útil en la certificación de la identidad de un animal específico. Además, el análisis de ADN permite identificar la especie de origen de las muestras de orina de fuente desconocida, para lo que usualmente se tipifica el ADN mitocondrial (ADNmt), que puede usarse para diferenciar especies.

Además de permitir el estudio de linajes debido a su herencia materna, los análisis discriminatorios basados en el ADNmt tienen aplicaciones importantes en agricultura, tecnología de los alimentos y en ciencias forenses, por ejemplo, para la detección de importación ilegal, exportación, caza de especies protegidas y robo de animales pecuarios, y más recientemente, para diferenciación de clones.

Si bien cada especie tiene características propias, dentro de los individuos que son parte de la misma especie existen variaciones genéticas o “alelos”.

Estas variaciones permanecen inalteradas durante la vida del animal, y si este se reproduce exitosamente, las transmite a la siguiente generación.

Hay diversos tipos de variaciones genéticas y multitud de formas de ponerlas en evidencia, por lo que los investigadores se han organizado a lo largo de muchos años para poder utilizar métodos que generen datos que sean comparables en cualquier rincón del mundo donde haya caballos.

En primera instancia, la muestra de orina cuestionada por dopaje positivo se procesa para extraer posibles inhibidores y así poder realizar el análisis molecular del ADN (Figura 1a-c). Se han propuesto diversas metodologías, principalmente para control de dopaje en humanos, por lo que el método empleado en la actualidad fue probado y optimizado en muestras de orina equina, tomadas en distintas condiciones pre y poscompetencia, y en diferentes condiciones de congelamiento (Vu y col, 1999; Villegas Castagnasso y col, 2003; Villegas Castagnasso y col, 2004; Diaz y col, 2008; Zappa, en prep). Para poder extraer el ADN de esta muestra, es fundamental que la orina haya sido tomada en condiciones de asepsia para evitar su contaminación y degradación, además de ser convenientemente homogeneizada antes de fraccionar los tubos de prueba y contraprueba.

De esta manera, una simple agitación de la muestra tomada aumenta las chances de poder obtener ADN pericial para el análisis molecular.

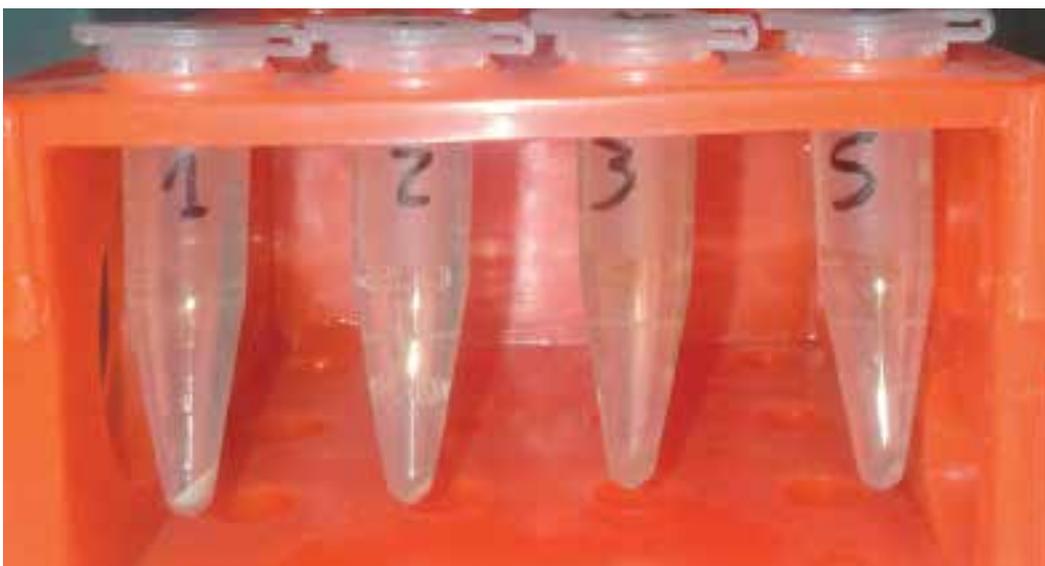


Figura 1: Procesamiento de la orina para extraer ADN a partir de células epiteliales descamadas del tracto urinario. **c:** el pellet celular es lavado y preparado para la extracción de ADN.

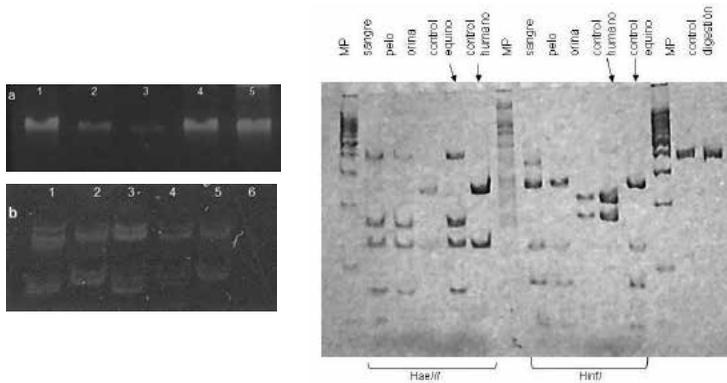


Figura 2: Determinación de la especie de origen de las muestras analizadas. Los patrones de bandas del gel corresponden a los resultados de la técnica de PCR-RFLP a partir del Cyt b en todas las muestras del caso y de los controles. Líneas: 1, 7 y 13: Marcador de peso molecular; 2 y 8: sangre; 3 y 9: pelo; 4 y 10: orina; 5 y 12: control equino; 6 y 11: control human; 14: PCR sin digerir. Tomado de: Díaz S y col, 2008. (Publicado en *Journal of Forensic Sciences* 53(5), 1145-1148).

¿Cómo se determina si la orina es del mismo caballo? Si se obtiene ADN a partir de la orina, este es analizado con un juego de marcadores moleculares conocidos como microsatélites, para conocer el genotipo del caballo.

Estos microsatélites son usados ampliamente para identificar equinos y tienen estandarización internacional (Marklund y col, 1994), que es coordinada por la International Association for Animal Genetics (ISAG), y cada dos años reúne los resultados de más de ochenta laboratorios de todo el mundo y establece el valor informativo del juego de marcadores, así como la eficacia de cada laboratorio participante.

De esta manera, los certificados de ADN de los caballos tipificados en Europa, contienen la misma información que aquellos tipificados en USA, Japón o Argentina, y facilitan importaciones, exportaciones e inscripciones en registros de razas puras.

Algunas características de los marcadores genéticos de ADN, y que son la razón de su uso desde hace varias décadas, es que se heredan y no cambian durante la vida del caballo, son relativamente sencillos de tipificar haciendo posible la comparación de los resultados entre laboratorios, y son muy variables (polimórficos), es decir, hay varios alelos posibles que se presentan combinados de a dos en cada individuo.

Estas características también hacen posible que sean útiles para verificar paternidades o maternidades cuestionadas, y en este caso, verificar la coincidencia (match) entre muestras para determinar si pertenecen a un mismo individuo.

En este caso, la comparación se hace entre el ADN obtenido de la muestra de orina positiva y el ADN extraído a partir de sangre o pelos del equino sospechado.

Las combinaciones de los doce marcadores tomados de a dos determinan el perfil genético de cada caballo, que dependiendo de la raza, presentara combinaciones diferentes, potenciadas por el polimorfismo de cada marcador, lo que permite establecer comparaciones entre muestras provenientes de distintos o del mismo individuo, con un 99,99% de certeza.

La probabilidad de que esa combinación de marcadores/alelos pertenezca a un individuo tomado al azar de la población de caballos dependerá de la forma en

que las variantes de los marcadores se distribuyen en la población (frecuencias alélicas), y es característica de cada raza. La conclusión del análisis se expresa como la probabilidad de que los perfiles genéticos comparados pertenezcan al mismo caballo, mediante un índice forense que puede variar, por ejemplo, entre $1,3 \times 10^{12}$ (calculado a partir de las frecuencias génicas para la raza SPC) y $1,9 \times 10^{10}$, cuando se calcula teniendo en cuenta el índice de consanguinidad de la misma raza ($\Theta = 0,1$).

Esto indica que existe una chance de 1 en 5 mil millones que las compatibilidades observadas sean fruto del azar y por lo tanto, que las dos muestras no pertenezcan al mismo animal.

Por lo tanto, si el perfil genético obtenido a partir de la muestra de orina coincide con el perfil obtenido a partir de la muestra de sangre o pelo del caballo, se verifica el “matching” de muestras con una alta probabilidad, y el caballo resulta inculgado. Por otra parte, si no hay coincidencia entre los perfiles genéticos de las muestras, concluimos que no pertenecen al mismo caballo, y por lo tanto, resulta “inocente”.

El caso de dopaje por sustitución

Un resultado positivo para dopaje por presencia de cafeína y sus metabolitos en la orina analizada, descalificó al caballo american trotter ganador de una prueba. Su propietario sospechaba de manipulación de las muestras de orina, y solicitó el análisis de ADN con el fin de comparar el perfil de ADN de la orina con el perfil genético de muestras de sangre y pelos tomadas del caballo cuestionado.

El análisis se inició con la extracción de ADN a partir de las muestras de orina, sangre y pelo, y se investigaron diez marcadores microsatélites de equinos para determinar la identidad del caballo. No se obtuvieron resultados cuando se tipificaron los marcadores específicos de equinos en la muestra de orina, pero sí a partir del ADN obtenido de sangre y pelo. Con el fin de verificar la especie de origen de la muestra de orina, se analizó el gen citocromo b del ADN mitocondrial, que está presente en todas las especies de mamíferos, pero presenta variaciones entre especies que permite diferenciarlas (Bravi y col, 2004) y se comparó con

ADN de referencia de especies conocidas. El análisis a partir de sangre y pelo mediante las técnicas de PCR-RFLP y secuenciación produjo resultados coincidentes con los esperados para equinos, mientras que los resultados de la muestra de orina coincidieron con los esperados para ADN humano (Figura 2). En este caso, se demostró que la muestra de orina era de origen humano, indicando la manipulación de las muestras (Díaz y col, 2008).

Consideraciones finales

La aplicación de las herramientas de la genética molecular, si bien permite diferenciar individuos o determinar parentescos, necesita del conocimiento del “entorno genético”. Este consiste en conocer a priori las características de las poblaciones y de las razas a las que pertenecen los individuos, para asignar correctamente la identidad.

Los análisis genéticos también pueden identificar la especie a partir de muestras de origen desconocido, pero no pondrán al descubierto si el caballo recibió sustancias prohibidas; sí permitirá determinar si una muestra de orina pertenece al caballo sospechado o no, y brindará evidencias y herramientas para los propietarios, cuidadores o responsables de los caballos para realizar las acciones necesarias.

Algunos requerimientos

- La orina debe estar siempre refrigerada. Si bien pueden realizarse tratamientos para minimizar los efectos del congelamiento, la muestra en buen estado de conservación aumenta las chances de obtener ADN.
- Se debe mantener la cadena de custodia. Para certificar la validez del resultado de la comparación de ADN

en los caballos cuestionados, es fundamental mantener la cadena de custodia de las muestras de orina. El seguimiento del caballo hasta que se toma la muestra de orina, y posteriormente de la orina hasta su análisis, son indispensables para certificar luego si efectivamente la

Dra. Silvana Díaz



Licenciada en Genética egresada de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM), finalizó su doctorado en Genética de Equinos por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) en 2003. Desde antes de graduarse ingresó en la Facultad de Ciencias Veterinarias de La UNLP, donde continúa desarrollando tareas de docencia en Genética e investigaciones en Genética de Equinos, en la línea de marcadores Genéticos en Animales Domésticos (GAD) del Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando N. Dulout” (IGEVET) CONICET-FCV, UNLP.

Actualmente es investigadora del CONICET, en el Área de Genética de Equinos, en proyectos de investigación que involucran la caracterización genética e inmunogenética de los caballos y su categorización a nivel histórico y evolutivo mediante estrategias genómico-funcionales. La integración de conocimientos es utilizada para identificar componentes genéticos de enfermedades de origen genético, enfermedades y características de razas, tales como resistencia a enfermedades y caracteres propios o biotipos que determinan sus aptitudes específicas. Es responsable de Área Equinos del Servicio de Diagnóstico Genético en Animales Domésticos del IGEVET, donde se realiza tipificación por ADN de equinos para identificación genética individual, paternidades/maternidades, robo, dopaje positivo.

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

*Existen los que observan la realidad...
y los que tratan de mejorarla.*

**Participe activamente
del Correo de Lectores**

enviándonos su opinión a **asocaave@gmail.com**

orina pertenece al mismo caballo cuestionado. El laboratorio de genética certifica las acciones realizadas desde que la muestra ingresa al mismo, pero no puede certificar su procedencia.

- El procedimiento está normalizado. Una vez que se recibe, el procedimiento involucra el pretratamiento de la muestra de orina, la extracción de ADN, el análisis de los marcadores genéticos y la comparación de los perfiles genéticos. Cada paso del procedimiento se registra y los datos se vuelcan en

un informe técnico del resultado del “match” entre muestras. Este análisis se realiza en el Servicio de Diagnóstico Genético en Animales Domésticos (GAD). Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout” (IGEVET), Centro Científico Tecnológico La Plata (CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Av 60 y 118 S/N, CC296, CP1900, La Plata, Argentina (Web: <http://www.igevet.gov.ar/servicios.html>). 🐾

TÉCNICAS DESCRIPTAS

Tomado de: Díaz S y col, 2008. (Publicado en *Journal of Forensic Sciences* 53(5), 1145-1148).

Genotipificación de ADN: Las muestras de ADN se tipificaron mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y genotipificación automatizada (Secuenciador Megabase 1000, GE Healthcare). Se utilizaron los protocolos y marcadores moleculares (loci STR) del panel recomendado por la International Society for Animal Genetics (ISAG). En cada procedimiento se incluyeron controles positivos y negativos. El método de genotipificación permitió la detección de los alelos de los marcadores moleculares equinos

denominados AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HTG4, HTG10, TKY333, TKY394, VHL20.

Identificación especie-específica: Las muestras de ADN se tipificaron por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa - Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) según el procedimiento detallado en Bravi y col. (2004). El método utilizado permite identificar especies animales mediante los diferentes patrones que generan las enzimas utilizadas.

Se utilizaron cebadores generalizados que permitieron amplificar un fragmento del gen mitocondrial Citocromo b en todas las muestras. Dichos

fragmentos fueron digeridos con las enzimas de restricción HaeIII y HinfI y sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida.

En el procedimiento se incluyeron controles negativos y positivos. Este método permitió identificar la especie de origen de las muestras analizadas (Figura 2).

Secuenciación automatizada: para confirmar los resultados obtenidos por el método de PCR-RFLP se determinó en forma automatizada la secuencia de bases del ADN del citocromo b mitocondrial a partir de todas las muestras utilizadas (Secuenciador Megabase 1000, GE Healthcare).

Referencias bibliográficas

- Bravi CM, JP Liron, PM Mirol, MV Ripoli, P Peral-García, G Giovambattista. (2004). A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. *Legal Medicine* 6, 246–251.
- Brinkmann B, Rand S, Bajanowski T. Forensic identification of urine samples. (1992). *Int J Legal Med* 105(1):59–61.
- Díaz S, Kienast ME, Villegas-Castagnasso EE, Pena NL, Manganare MM, Posik DM, Peral-García P, Giovambattista G. (2008). Substitution of Human for Horse Urine Disproves an Accusation of Doping. *Journal of Forensic Sciences* 53(5), 1145-1148.
- Marklund S, Ellegren H, Eriksson S, Sandberg K, Andersson L. (1994). Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim Genet* 25(1):19–23.
- Thevis M, Geyer H, Mareck U, Sigmund G, Henke J, Henke L, et al. (2007). Detection of manipulation in doping control urine sample collection: a multidisciplinary approach to determine identical urine samples. *Anal Bioanal Chem* 388(7):1539–1543.
- Ungemach FR. (1985). Doping control in race horses. *Tierarztl Prax* 13(1):35–53.
- Villegas Castagnasso EE, It V, Díaz S, Liron JP, Kienast ME, Ripoli MV, Peral García P, Giovambattista G. (2003). Método de tipificación de ADN a partir de muestras de orina: Su utilidad en la resolución de casos de doping positivos en equinos. *Basic and Applied Genetics* 15 (Sup 2):47.
- Villegas-Castagnasso E, It V, Díaz S, Liron JP, Rogberg-Muñoz A, Kienast ME, Ripoli MV, Maderna CR, Peral-García P, Giovambattista G. (2004). Método de tipificación de ADN a partir de muestras de orina: Su utilidad en la resolución de casos de doping positivos en equinos. *Analecta Veterinaria* 24(1):11-13. Versión en CD-ROM. FCV. UNLP.
- Vu NT, Chaturvedi AK, Canfield DV. (1999). Genotyping for DQA1 and PM loci in urine using PCR-based amplification: effects of sample volume, storage temperature, preservatives, and aging on DNA extraction and typing. *Forensic Sci Int* 102(1):23–34.