

IDENTIFICACIÓN Y CHEQUEO DE PARENTESCO EN LA ESPECIE CANINA MEDIANTE ANÁLISIS DE ADN.

M.P. Aznar, I. Martín Burriel, R. Osta,
P. Zaragoza.

Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos
Sanguíneos.
Facultad de Veterinaria.
Miguel Servet, 177.
50013 Zaragoza.

RESUMEN

Este trabajo presenta los primeros resultados en España de un estudio de identificación y chequeo de parentesco en la especie canina mediante microsatélites (polimorfismos del ADN). Para este trabajo se han utilizado 79 animales, 48 de los cuales no están emparentados y 31 que pertenecen a 3 familias, en los que se han analizado 11 microsatélites. Los resultados indican la posibilidad de utilizar estos marcadores en test de paternidad con resultados altamente fiables (99%), si se utilizan más de 7 microsatélites.

Palabras clave: Identificación; Chequeo de parentesco; Microsatélites; Exclusión de paternidad; Perro.

ABSTRACT

This work presents the first results in Spain of an study concerning identity and parentage test in dogs by microsatellites (DNA polymorphisms). 79 animals have been used for this work, (48 unrelated dogs and 31 dogs from 3 families). Our main conclusion is the necessity of using more than 7 microsatellites in order to obtain results with 99% of guaranty.

Key words: Identity; Parentage test; Microsatellites; Paternity exclusion; Dog.

INTRODUCCIÓN.

La genética molecular es un campo de la biotecnología en el que se están abriendo actualmente muchas posibilidades de futuro, con espectaculares implicaciones en todos los campos de la biología, desde el sexaje de embriones o la producción de vacunas hasta la identificación y chequeo de parentesco.

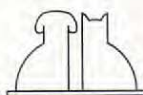
En especies de interés económico, la identificación genética y el obligado establecimiento de pruebas de paternidad y/o maternidad, queda hoy lejos de cualquier duda como argumento para la fiabilidad y credibilidad de los libros genealógicos en las distintas razas⁽¹⁾.

En los últimos años ha habido un incremento de los estudios en el área de la genética canina motivada por los avances en el conocimiento del genoma de distintas especies. En concreto, en el campo de la identificación y chequeo de parentesco de la especie canina en España, el tatuaje o

la utilización de un microchip son en la actualidad las únicas posibilidades que existen. La utilización de marcadores moleculares a nivel de ADN abre nuevas perspectivas en la identificación genética debido a que no es posible ninguna manipulación del ADN (material empleado en la identificación).

Dentro de los marcadores genéticos se buscan aquellos que tengan gran variabilidad en las poblaciones. Unos de los marcadores que ofrecen estas ventajas son los microsatélites. Estos marcadores ya están siendo utilizados debido a su gran variabilidad y precisión en las pruebas de filiación en distintas especies animales y también en el hombre.

Además de su utilización en la identificación y chequeo de parentesco los microsatélites son herramientas de vital importancia en el desarrollo del mapa genético canino *Dog Map*, ya que es necesario disponer de un número suficiente de marcadores altamente polimórficos para poder obtener la máxima información.



Otro campo que está cobrando importancia es el estudio de las enfermedades hereditarias en animales domésticos. En los perros de pura raza, una relativa consanguinidad y el establecimiento de razas a partir de pequeños *pools* de genes, ha originado la expresión de numerosas enfermedades: displasia de cadera^(2, 3), diabetes mellitus⁽⁴⁾. Más de 350 enfermedades han sido identificadas y su número va en aumento⁽⁵⁾.

El presente estudio está centrado en la investigación biológica de la paternidad en el perro. En primer lugar se abordan las causas de paternidad dudosa y los requisitos que deben poseer los marcadores utilizados en las pruebas de identificación y chequeo de parentesco. A continuación, se analizan los distintos marcadores (grupos sanguíneos, polimorfismos proteicos y polimorfismos del ADN). Finalmente se indica la probabilidad de exclusión de paternidad según el tipo y número de marcadores y se extraen las conclusiones.

CAUSAS DE PATERNIDAD DUDOSA.

Los certificados que se expiden en la actualidad no proporcionan la suficiente garantía de pedigrí de los perros, ya sea por causas accidentales que dan lugar a paternidades dudosas o por fraudes a la hora de registrar a los animales en una raza.

Los casos más frecuentes de paternidad dudosas son:

1. Demostrar por parte de los dueños que su perro no es padre de una determinada camada.
2. Determinar entre dos o más perros cual es el padre de un determinado cachorro.
3. Cuando una hembra es cruzada con dos machos, determinar cual es el padre de los cachorros de la camada.
4. Determinar cual es el verdadero padre cuando se ha realizado inseminación artificial (actualmente con más de una pajuela).

REQUISITOS QUE DEBEN CUMPLIR LOS MARCADORES GENÉTICOS.

Un pre-requisito para la utilización de un marcador genético en el chequeo de parentesco es

que sea de dominio público y con herencia mendeliana conocida. Además la estabilidad germinal ha debido ser confirmada. Las relaciones de ligamiento con otros marcadores utilizados en el test tienen que ser igualmente conocidas.

Por otra parte, otras características necesarias son:

- Elevada variabilidad entre individuos (evitar en lo posible la presencia de homocigotos en las poblaciones).
- Deben corresponder a caracteres hereditarios discontinuos que permitan distribuir los animales en clases bien diferenciadas unas de otras.
- No debe existir ninguna influencia ambiental, lo que permite realizar su análisis en cualquier momento.
- No debe suponer ningún riesgo para el animal.
- El análisis debe ser sencillo y rápido.
- Los resultados deben ser siempre repetibles.

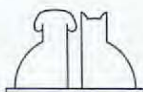
MARCADORES GENÉTICOS EN LA ESPECIE CANINA.

La cría de animales nos plantea dudas acerca de la identidad biológica de estos, cuya resolución es posible mediante análisis genéticos. Un ejemplo muy frecuente son las disputas sobre la paternidad. Asimismo algunas asociaciones de criadores utilizan la genética para verificar la identificación de animales registrados.

Durante los años 1970 ha sido posible realizar el chequeo de parentesco en varias especies de animales domésticos como el bovino y el equino. Para este propósito los sistemas de grupos sanguíneos y polimorfismos de proteínas de la sangre han sido muy útiles porque se determinan mediante un gen y pueden ser demostrados con gran seguridad. Su utilidad ha sido tan evidente que existe una legislación al respecto, indicando la obligatoriedad de su uso incluso en este momento.

No obstante, las posibilidades de identificación y control de parentesco en perros mediante la tipificación sanguínea han estado limitadas ya que hay pocos marcadores genéticos de la sangre de fácil uso y los que hay son poco polimórficos.

Aunque un elevado número de marcadores genéticos han sido detectados en la sangre de los perros^(6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13), su utilización para controles de pedigrí está bastante limitada debido a que se desconocen las frecuencias alélicas en las distintas razas de perros.



En la década de los 80 se abrió una nueva puerta para la genética con la aparición de unos marcadores de DNA: los RFLPs (polimorfismos de la longitud de los fragmentos originados por cortes del DNA cuando se usan enzimas de restricción)⁽¹⁴⁾. El problema de estos marcadores es que son poco variables (generalmente dialélicos), lo que hace que su utilización en análisis de pedigrís esté limitada por su baja heterocigosidad.

Otros marcadores del DNA que han sido utilizados son los minisatélites, regiones del genoma que se caracterizan por una secuencia central que se repite un número variable de veces⁽¹⁵⁾, lo que hace que tengan distintos tamaños y diferencias entre individuos. Tienen la ventaja de que son muy polimórficos pero tienen problemas de interpretación.

En 1989, cuatro laboratorios aprovechando una nueva tecnología, la reacción en cadena de la polimerasa, detectaron un elemento genético con un inusual grado de polimorfismo: los microsatélites, también conocidos como STR (*short tandem repeat*).

Los microsatélites consisten en alrededor de 10 a 50 copias de repeticiones de 1 a 6 pares de bases (p.e. (GA)₁₆ o (CAAT)₁₁). Aparecen frecuentemente y distribuidos al azar en el genoma de todas las eucariotas.

Su elección como marcadores genéticos en pruebas de identificación y chequeo de parentesco es debida a varias razones:

- Herencia mendeliana codominante.
- Facilidad de detección en pequeñas muestras de sangre, semen, pelo.
- Elevado grado de polimorfismo (gran variación entre individuos).
- Baja frecuencia de mutación.
- Alta fiabilidad.
- Bajo coste.
- Es posible su determinación usando técnicas relativamente simples.
- La o las variantes (alelos) presentes en un hijo tienen que estar presentes en sus padres.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO O PROBABILIDAD DE EXCLUSIÓN DE PATERNIDAD.

La prueba de paternidad está basada en una asimetría lógica Popperiana entre la verdad y la mentira. Así, mientras la exclusión de paternidad es lógicamente irrefutable, la prueba de paterni-

dad verdadera (compatibilidad) depende de una inferencia basada en el error de exclusión.

La fórmula de la paternidad de exclusión de Jamieson⁽¹⁶⁾ nos proporciona la probabilidad de que una serie de alelos codominantes, como son los de los microsatélites, de frecuencia conocida y en un locus determinado (cada uno de los microsatélites es un locus) pueda detectar un falso registro de padre o madre.

$$Pe_n = \sum Pi(1-Pi)^2 - \sum (Pi \cdot Pj)^2 (4-3(Pi+Pj))$$

En la práctica, el material debe ser testado para varios loci codominantes, cada uno de los cuales tiene un número determinado de alelos. La probabilidad de exclusión de paternidad (Pe) es una probabilidad de inclusión de paternidad ($Pi=1-Pe$). Esto nos permite determinar la probabilidad de exclusión combinada de todo el sistema de loci⁽¹⁷⁾.

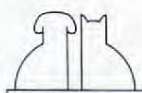
$$Pk = 1 - ((1-Pe_1) \times (1-Pe_2) \dots (1-Pe_n))$$

Hasta el momento en nuestro laboratorio se están utilizando 11 microsatélites conocidos y estudiados en distintas razas de perros como Rotweiler, Pointer o Welsh Terrier y que se utilizan en países como Australia o Reino Unido. El número de alelos obtenidos varía entre 5 y 9. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio respecto al porcentaje de exclusión combinada aparecen en la Tabla I.

No obstante, dada la falta de estudios en este tema en las distintas razas de la población canina española, las frecuencias y, por tanto, los porcentajes de exclusión en cada microsatélite pueden variar según la raza o línea, dependiendo mucho de la consanguinidad existente. Por ello creemos que es necesaria la utilización de más de 7 microsatélites para dar un informe de paternidad totalmente fiable.

TABLA I. Porcentaje de exclusión combinada de diversos microsatélites en la especie canina.

Cantidad de microsatélites analizados	Porcentaje de exclusión combinada
Microsatélite 1	0,4561
Microsatélite 1,2	0,7771
Microsatélite 1, 2,3	0,8840
Microsatélite 1, 2, 3, 4	0,9289
Microsatélite 1, 2, 3, 4, 5	0,9719
Microsatélite 1, 2, 3, 4, 5, 6	0,9864
Microsatélite 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	0,9922
> 7 Microsatélites	>0,99



CERTIFICACION DE ANALISIS DE MARCADORES GENETICOS: MICROSATELITES Certification of genetic markers: Microsatellites

SOLICITADO PARA: IDENTIFICACION ☐ FILIACION ☐ OTROS ☐
GENETICA

Nombre y apellidos del criador u organizacion - Individual or organization for whom typing is made	Nº CERTIFICADO
Direccion completa - Full address	

MICROSATELITES ANALIZADOS - MICROSATELLITES ANALYZED
VIAS D10 002 004 101 111 LEI 008 RVC1 RVC4 RVC8 RVC11 RVCE

ANIMAL	Nombre:	Nº Registro:	Nº Lab:
	Name:	H.B. No:	Lab No:
Raza:	Sexo:	Fecha nac.:	Otros datos:
Breed:	Sex:	Birth date:	Other data:
RESULTADOS DE LA TIPIFICACION - TYPING RESULTS			
VIAS D10	002	004	101
RVC1	RVC4	RVC8	RVC11

PADRE - SIRE	Nombre:	Nº Registro:	Nº Lab:
	Name:	H.B. No:	Lab No:
Raza:	Sexo:	Fecha nac.:	Otros datos:
Breed:	Sex:	Birth date:	Other data:
RESULTADOS DE LA TIPIFICACION - TYPING RESULTS			
VIAS D10	002	004	101
RVC1	RVC4	RVC8	RVC11

MADRE - DAM	Nombre:	Nº Registro:	Nº Lab:
	Name:	H.B. No:	Lab No:
Raza:	Sexo:	Fecha nac.:	Otros datos:
Breed:	Sex:	Birth date:	Other data:
RESULTADOS DE LA TIPIFICACION - TYPING RESULTS			
VIAS D10	002	004	101
RVC1	RVC4	RVC8	RVC11

El Director que suscribe certifica:
 Que se ha efectuado el análisis de la tipificación
 genética del animal objeto del estudio.
 La fórmula genética de este animal
 en relación a las de los progenitores arriba indicados
 (de los que se obtienen los datos y muestras según
 los documentos de identificación correspondientes) es:

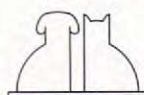
The Director hereby certifies:
 That was made the genetic typing
 of the animal in question.
 The genetic type of this animal, in relation to the
 parent/s listed above (from which data and
 samples were obtained according with the documents of
 identification) is:

--

Zaragoza,

Pilar ZARAGOZA FERNANDEZ
 Directora del Servicio

Fig. 1. Informe de paternidad para la especie canina. En dicho informe figuran los animales estudiados, los marcadores genéticos utilizados y los resultados fenotípicos observados. Finalmente se señala la compatibilidad o incompatibilidad.



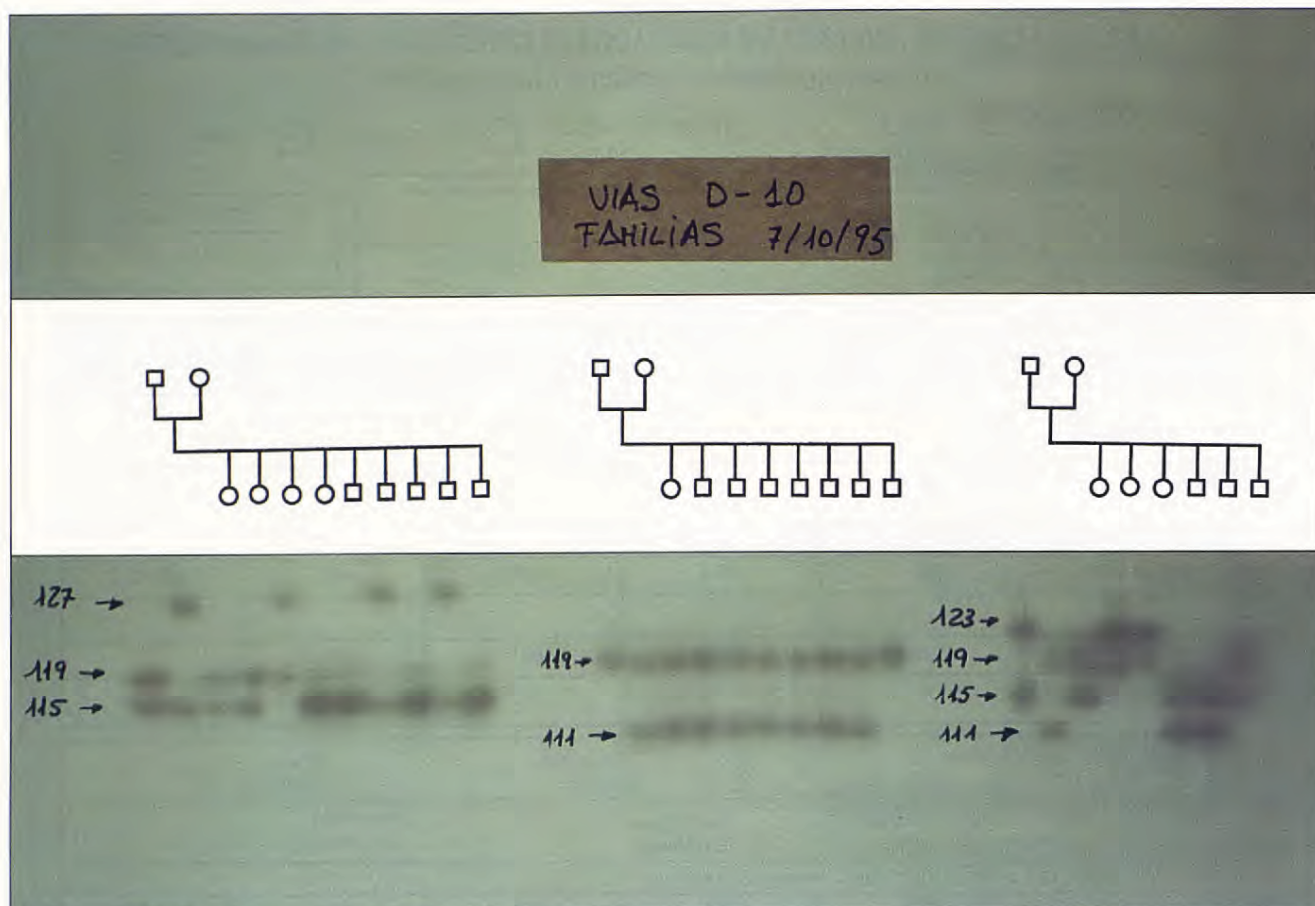


Fig. 2. Autorradiografía correspondiente al microsatélite VIAS D-10 en la que pueden observarse tres familias, en el orden que señalan los esquemas. Cada animal posee dos alelos, un alelo heredado del padre y otro de la madre. Si tomamos uno cualquiera de los hijos que aparecen en la fotografía podemos comprobar que, en efecto, uno de los alelos provienen de la madre y otro del padre. En ese caso, el informe de paternidad señalará la compatibilidad de ese animal con el padre y la madre estudiados y para el marcador VIAS D-10.

El resultado del análisis es un informe de paternidad en el que figuran los animales estudiados, los marcadores genéticos utilizados y los resultados fenotípicos observados. En cuanto al resultado final se señala la compatibilidad (no puede afirmarse categóricamente la paternidad) o la incompatibilidad (en este caso es irrefutable) (ver Fig. 1).

A continuación mostramos la imagen real de tres casos de compatibilidad realizados con el microsatélite VIAS-D10⁽¹⁸⁾ (ver Fig. 2). En cada una de las tres familias aparece en primer lugar el padre, en segundo lugar la madre y después los hijos. Puesto que cada uno de los hijos recibe un alelo del padre y otros de la madre, y esto puede confirmarse en cada uno de los hijos de las tres familias, podemos asegurar que todos los hijos son compatibles. No obstante, y como se ha señalado anteriormente, para confirmar esta compatibilidad es necesario realizar esta prueba con al menos 6 microsatélites más y si es posible con un número superior.

CONCLUSIONES.

De todo lo anterior cabe concluir:

1. El mapa genético de las diferentes especies ha impulsado la búsqueda de marcadores útiles en estudios de ligamiento como son los microsatélites.
2. Las causas accidentales y los fraudes dan lugar a problemas de identificación y paternidades dudosas.
3. Esta problemática plantea la necesidad de buscar marcadores que se hereden de forma mendeliana y presenten una alta variabilidad.
4. Los microsatélites cumplen estos requisitos, por tanto son marcadores de elección.
5. Los análisis estadísticos revelan la necesidad de utilizar más de 7 microsatélites para aportar resultados con garantía.
6. Estos resultados se recogen en el informe de paternidad señalando la compatibilidad o incompatibilidad biológica.



BIBLIOGRAFÍA.

1. Zarazaga, I., Zaragoza, P., Amorena, B., Rodellar, C. Identificación genética en vacuno. *Mundo ganadero* 3: 70-72, 1994.
2. Hutt, F.B. Genetics for dogs breeders, New York, Freeman, 1979.
3. Robinson, R. Genetics for dogs breeders, New York, Pergamon Press, 1982.
4. Kramer, J.W. *et al.* *Diabetes* 29: 558-565, 1980.
5. Robinson, R. Genetic anomalies in dogs. *Canine practice* 16: 29-34, 1991.
6. Baur, E.W., Schorr, R.T. Genetic polymorphism of tetrazolium oxidase in dogs. *Science*, Washington D.C. 166: 1524-1525, 1969.
7. Braend, M., Austad, R. Polymorphism of red cell acid phosphatase in dogs. *Animal blood Groups and Biochemical Genetics* 4: 189-192, 1973.
8. Pürstl, J. *Genetischer Polymorphismus in Serum und Erythrozytenhaemolysat beim Hund*. Dissertation, Wien, 1975.
9. Tanabe, Y., Sugiura, S., Asanoma, M., Ota, K. Genetic polymorphism of leucine aminopeptidase in canine plasma. *Animal Blood groups and Biochemical Genetics* 5: 225-230, 1974.
10. Tanabe, Y., Omi, T., Ota, K. Genetic variants of glucose phosphate isomerase (E.C. 5.3.1.9.) in canine erythrocytes. *Animal Blood groups and Biochemical Genetics* 8: 191-195.
11. Tanabe, Y., Omi, T., Ota, K. Genetic variants of hemoglobin in canine erythrocytes. *Animal Blood groups and Biochemical Genetics* 9: 79-83, 1978.
12. Vriesendorp, H.M. Joint Report of 1st International Workshop on Canine Immunogenetics. *Tissue Antigens* 3: 145-172, 1973.
13. Vriesendorp *et al.* Joint Report of the Second International Workshop on Canine Immunogenetics. *Transplantation Proceedings* 8, 289-311, 1976.
14. Fries, D. Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy. *Animal Genetics* 24: 111-116, 1993.
15. Wyman, A., White, R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6754-8, 1980.
16. Jamieson A. The genetic of transferrins in cattle. *Heredity* 20: 419-441, 1965.
17. Wiener, A.S., Lederer, M., Polayes, S.H. Studies in isohemagglutination. *J. Immun.* 19: 259-282, 1930.
18. Primmer, C.R., Matthews, M.E. Canine tetranucleotide repeat polymorphism at the VIAS-D10 locus. *Animal Genetics* 24: 332, 1993.

