

J. Jordana
A. Sánchez
J. Piedrafita

Probabilidad de detección de pedigrees erróneos mediante polimorfismos bioquímicos en razas caninas españolas

Unitat de Millora Genètica Animal,
Departament de Patologia
i de Producció Animals,
Facultat de Veterinària,
Universitat Autònoma de Barcelona,
08193 Bellaterra,
Barcelona.

RESUMEN

Mediante técnicas convencionales de electroforesis, se realiza un estudio poblacional de once marcadores genéticos sanguíneos -polimorfismos bioquímicos- para un total de 484 individuos, pertenecientes a diez razas caninas españolas.

La información aportada a partir de los valores de las frecuencias génicas de los once sistemas polimórficos, nos permite estimar, en cada una de las razas, las probabilidades de detección de errores en el pedigree. Considerando los once polimorfismos conjuntamente, y en el caso de un único individuo analizado por camada, se obtienen unos valores que oscilan entre el 72,02% para la raza Ca de Bestiar y el 83,02% para la raza Mastín Español, con un valor promedio del 78,29% para el conjunto de las razas. La probabilidad de exclusión de falsas filiaciones se incrementa hasta un valor promedio, para las diez razas, del 92,07%, con unos valores extremos del 88,55% para Ca de Bestiar y del 94,68% para Mastín Español, si se analizan cinco descendientes por camada.

Se discute asimismo, la relación eficacia/coste de cada uno de los sistemas de detección (electroforesis en gel de almidón, en gel de poliacrilamida y bidimensional) en el protocolo de control de parentesco.

PALABRAS CLAVE

Perro; Polimorfismo; Pedigree.

ABSTRACT

A total of 11 genetic loci encoding enzymes and other blood proteins has been assayed by conventional techniques of electrophoresis in 484 individuals, belonging to 10 spanish breeds of dogs. In each breed the information provided by the values of the allelic frequencies in the 11 polymorphic systems can be used to assess the probabilities to detect erroneous pedigrees. Using the whole set of the 11 polymorphisms, and in the case of 1 individual analyzed per litter, the values ranged between 72,02% for the "Ca de Bestiar" breed and 83,02% in the "Mastín Español" breed, with an average of 78,29%. The probabilities to exclude false filiations increase to an average of 92,07% for the 10 breeds, from 88,55% in "Ca de Bestiar" to 94,68% in "Mastín Español", if 5 offsprings are used per litter in the analysis.

The relationship between the efficiency and the cost of each system of detection (electrophoresis in starch

152 *gel, in polyacrilamide gel and bidimensional) in the protocol of control of relationship is also discussed.*

KEY WORDS

Dog; Polymorphism; Pedigree.

INTRODUCCION

El control de parentesco o la filiación incorrecta de un individuo respecto a unos determinados progenitores, es objeto de creciente preocupación para los criadores de perros, sus organismos profesionales, y en general para cualquier potencial comprador que desee un determinado animal de pedigree contrastado. La creciente importancia socio-económica que están adquiriendo determinadas razas caninas, entre ellas algunas españolas, es motivo suficiente para dedicar una atención especial al tema en cuestión.

Aunque hoy en día, desde el punto de vista técnico, existe una metodología adecuada para la verificación de posibles paternidades aducidas en la especie canina⁽¹⁻⁶⁾, su utilización de forma rutinaria está lejos de ser una realidad en nuestro país.

El principio de todas las pruebas de exclusión de paternidad, con la ayuda de marcadores genéticos -polimorfismos bioquímicos-, se basa en que cualquier alelo cuyo producto detectemos en un individuo, debe estar presente al menos en uno de los padres. Cuando esto sucede, el parentesco supuesto es compatible -posible-, en caso contrario es incompatible.

Aunque los polimorfismos bioquímicos no pueden darnos la prueba irrefutable de que un determinado macho es de hecho el verdadero progenitor del individuo, ya que siempre existe la posibilidad de que uno falso pueda poseer, debido al azar, una combinación de genes compatible con el parentesco, sin embargo, cuando el número de marcadores genéticos aumenta, la probabilidad de asignar una falsa paternidad, debida al azar, disminuye.

Las probabilidades de exclusión no tienen por qué coincidir en diferentes razas, siendo por tanto inapropiado extrapolar los resultados obtenidos en una determinada población hacia otras. Para cada raza la información aportada por un determinado polimorfismo puede ser distinta, ya que depende del número de

alelos existentes y de los valores de las frecuencias génicas de los mismos. Un locus génico aportará el máximo de información cuanto mayor sea el número de alelos detectados y cuando las frecuencias génicas de dichos alelos tomen valores intermedios.

Es por esto que presentamos aquí los resultados de un primer estudio realizado a partir de la información aportada por once marcadores genéticos sanguíneos de diez razas caninas españolas.

MATERIAL Y METODOS

Se han estimado las frecuencias génicas referentes a once polimorfismos bioquímicos, mediante técnicas convencionales de electroforesis -electroforesis en gel de almidón, poliácridamida y agarosa-poliácridamida (bidimensional), con las modificaciones oportunas para cada caso⁽⁴⁾, en diez poblaciones caninas españolas: Gos d'Atura, con una muestra integrada por 93 animales, Mastín de los Pirineos (55), Mastín Español (45), Perdiguero de Burgos (42), Galgo Español (31), Sabueso Español (53), Ca de Bestiar (46), Podenco Ibicenco (71), Podenco Canario (15) y Podenco Ibérico (33).

Los once sistemas polimórficos analizados han sido los siguientes: Superóxido dismutasa (Sod), Leucin aminopeptidasa (Lap), Manosa fosfato isomerasa (MPI), Albúmina (Alb), Peptidasa-D (Pep-D), Transferrina (Tf), α 1B-Glicoproteína (α 1B), α 1-Proteasa inhibidor (Pi-1), Pretransferrina-1 (Prt-1), Pretransferrina-2 (Prt-2) y Postalbúmina-1 (Pa-1).

La expresión⁽⁶⁾ que permite estimar la probabilidad promedio de excluir la presunta paternidad de un macho, mediante un único sistema compuesto de dos alelos codominantes (A y B) es la siguiente:

$$P_{AB} = p_A q_B (1 - p_A q_B)$$

donde p_A y q_B son las frecuencias génicas de A y B respectivamente.

Existe asimismo⁽³⁾ una fórmula general aplicable a sistemas con "n" alelos codominantes.

$$P_n = \sum_i p_i (1 - p_i)^2 - \sum_{i>j} (p_i p_j)^2 \cdot [4 - 3(p_i + p_j)]$$

siendo $p_{i,j}$ las frecuencias alélicas de los genes i y j respectivamente.

Si se utilizan "m" sistemas, se puede calcular la probabilidad total o combinada a partir de la siguiente expresión:

$$P_T = 1 - (1 - P_1)(1 - P_2) \dots (1 - P_i) \dots (1 - P_m)$$

Estas fórmulas son válidas para exclusiones de pa-

Tabla 1 Valores de las frecuencias génicas obtenidos para cada uno de los 11 loci polimórficos en las diez razas caninas españolas

Locus	Alelo	GA	MP	ME	PB	GE	SE	CB	PE	PC	PI
Sod	(N)	93	55	45	42	31	53	46	71	15	33
	A	0,973	0,918	0,878	1,000	0,952	0,868	0,967	0,993	1,000	0,955
	B	0,027	0,082	0,122	0,000	0,048	0,132	0,033	0,007	0,000	0,045
Lap	(N)	93	55	45	42	31	53	46	71	15	33
	A	0,968	0,991	1,000	0,988	0,952	1,000	1,000	0,930	0,967	1,000
	B	0,032	0,009	0,000	0,012	0,048	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000
MPI	(N)	85	49	27	42	24	35	41	63	10	27
	A	0,906	0,724	0,667	0,821	0,688	0,857	0,817	0,937	0,700	0,981
	B	0,094	0,276	0,333	0,179	0,313	0,143	0,183	0,063	0,300	0,019
Alb	(N)	93	55	45	42	31	53	46	70	15	32
	S	0,575	0,518	0,667	0,821	0,452	0,377	0,848	0,529	0,867	0,578
	F	0,425	0,482	0,333	0,179	0,548	0,623	0,152	0,471	0,133	0,422
Pep-D	(N)	93	55	45	42	31	45	46	71	15	33
	A	0,876	0,964	0,900	0,905	0,903	0,900	0,870	0,958	0,933	0,909
	B	0,124	0,036	0,100	0,095	0,097	0,100	0,130	0,042	0,067	0,091
Tf	(N)	93	55	45	42	31	52	46	70	15	33
	A	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,029	0,000	0,000
	B	0,457	0,582	0,300	0,107	0,500	0,587	0,272	0,257	0,067	0,424
	C	0,532	0,418	0,489	0,881	0,500	0,404	0,728	0,714	0,933	0,545
	D	0,000	0,000	0,211	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
α-B	(N)	93	55	45	42	31	53	46	71	15	33
	S	0,602	0,273	0,589	0,429	0,661	0,443	0,348	0,796	0,633	0,561
	F	0,398	0,727	0,411	0,571	0,339	0,557	0,652	0,204	0,367	0,439
Pi-1	(N)	93	55	45	42	31	53	46	71	15	33
	S	0,231	0,155	0,600	0,190	0,290	0,236	0,098	0,585	0,133	0,273
	I	0,161	0,073	0,011	0,333	0,097	0,028	0,033	0,049	0,300	0,136
	F	0,608	0,773	0,389	0,476	0,613	0,736	0,870	0,366	0,567	0,591
Ptr-1	(N)	91	55	45	42	31	43	46	69	15	32
	S	0,055	0,018	0,044	0,000	0,000	0,058	0,054	0,022	0,100	0,063
	F	0,709	0,718	0,778	0,655	0,468	0,744	0,402	0,630	0,667	0,656
	D	0,236	0,264	0,178	0,345	0,532	0,198	0,543	0,348	0,233	0,281
Ptr-2	(N)	89	54	40	42	29	40	45	67	15	31
	S	0,028	0,028	0,013	0,012	0,052	0,025	0,000	0,007	0,000	0,032
	F	0,972	0,972	0,987	0,988	0,948	0,975	1,000	0,993	1,000	0,968
Ptr	(N)	66	34	28	30	30	34	37	40	15	23
	S	0,636	0,691	0,750	0,750	0,667	0,691	0,135	0,675	0,800	0,696
	F	0,364	0,309	0,250	0,250	0,333	0,309	0,865	0,325	0,200	0,304

(N) corresponde al tamaño de muestra analizado

ternidad a partir de un único descendiente, y pueden usarse como control de rutina en razas de especies uníparas.

Sin embargo, en las especies múltiparas, como el perro, podemos obtener una información adicional

utilizando más de un descendiente por camada. La probabilidad de exclusión es función del número de cachorros analizados. Dicha probabilidad se optimiza cuando se dispone de cinco descendientes, a partir de este número los incrementos de probabilidad son mi-

Tabla 2 Probabilidad de exclusión de paternidad mediante los once sistemas polimórficos considerados aisladamente, cuando disponemos de un único individuo (m=1) y cuando se dispone de cinco individuos analizados por camada (m=5)

	<i>Sod</i>	<i>Lap</i>	<i>MPF</i>	<i>Alb</i>	<i>Pep-D</i>	<i>Tf</i>	<i>α1-b</i>	<i>Pi-1</i>	<i>Prt-1</i>	<i>Prt-2</i>	<i>Pa-1</i>
GA m=1	2,56	3,00	7,79	18,46	9,68	20,00	18,22	29,40	21,12	2,65	17,79
m=5	4,90	5,73	13,78	27,77	16,59	30,27	27,47	44,37	33,45	5,08	26,95
MP m=1	6,96	0,88	15,99	18,73	3,35	18,41	15,91	19,07	17,92	2,65	16,79
m=5	12,48	1,74	24,79	28,10	6,36	27,70	24,69	31,37	28,12	5,08	25,75
ME m=1	9,56	0,00	17,28	17,28	8,19	34,08	18,35	19,56	17,51	1,27	15,23
m=5	16,42	0,00	26,33	26,33	14,39	49,08	27,63	29,61	28,82	2,48	23,88
PB m=1	0,00	1,17	12,54	9,38	7,86	10,02	18,49	33,79	17,49	1,17	15,23
m=5	0,00	2,30	20,50	16,16	13,88	17,56	27,81	48,82	26,59	2,30	23,88
GE m=1	4,36	4,36	16,90	18,63	8,00	18,75	17,39	26,74	18,70	4,69	17,28
m=5	8,15	8,15	25,87	27,98	14,08	28,12	26,46	30,24	28,06	8,72	26,33
SE m=1	10,14	0,00	10,75	17,97	8,20	19,55	18,59	18,19	19,87	2,38	16,79
m=5	17,25	0,00	18,10	27,16	14,39	29,39	27,92	28,96	32,14	4,59	25,75
CB m=1	3,09	0,00	12,72	11,23	10,03	15,88	17,54	11,62	24,68	0,00	10,31
m=5	5,89	0,00	20,73	18,76	17,09	24,66	26,65	20,33	37,28	0,00	17,49
PE m=1	0,70	6,63	5,55	18,71	3,86	19,01	13,60	23,70	20,34	0,70	17,12
m=5	1,37	12,38	10,19	28,07	7,28	29,94	21,86	35,92	31,06	1,37	26,15
PC m=1	0,00	3,09	16,59	10,20	5,86	5,86	17,83	29,77	25,14	0,00	13,44
m=5	0,00	5,89	25,51	17,33	10,69	10,69	27,89	44,36	39,13	0,00	21,66
PI m=1	4,11	0,00	1,83	18,44	7,59	22,23	18,56	29,24	23,37	3,00	16,68
m=5	7,72	0,00	3,56	27,74	13,46	33,69	27,89	43,92	36,17	5,73	25,62

nimos⁽²⁾. Para este tamaño de camada la expresión a utilizar sería:

$P_n = 1 + \sum_i [p_i^2 (2-p_i)]^2 - 2[\sum_i p_i^2 (2-p_i)]^2 + 4 (\sum_i p_i^3)^2 - 4 \sum_i p_i^6$,
simplificándose la fórmula para un locus génico con dos alelos a:

$$P_n = 2pq - 5p^2q^2 + 6p^3q^3$$

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se presentan, para cada raza, con el análisis de los once polimorfismos bioquímicos, los valores de las frecuencias génicas obtenidos. A partir

de dichos valores se calculan las probabilidades promedio de detectar errores de pedigree con cada uno de dichos sistemas y la probabilidad total combinada para cada una de las razas. Asimismo se realizan los cálculos para la exclusión de paternidad en el caso de que se disponga de cinco cachorros pertenecientes a la misma camada, tal como muestran las Tablas 2 y 3.

Lógicamente, los sistemas que aportan más información son aquellos con frecuencias génicas intermedias y con un elevado número de alelos. Sin embargo, en la utilización de los polimorfismos bioquímicos como método de rutina para la detección de filiaciones erróneas, debemos procurar que su relación eficacia/coste sea la

Tabla 3 Probabilidad combinada de exclusión de paternidad mediante los sistemas polimórficos estudiados, en las diez razas caninas españolas. Se distinguen los casos para uno y cinco descendientes analizados por camada, teniendo en cuenta las tres opciones posibles de metodología laboratorial.

	<i>m=1</i>			<i>m=5</i>		
	(A)	(B)	(C)	(A)	(B)	(C)
Gos d'atura	81,29	63,55	70,84	93,95	81,38	87,02
Mastín de los Pirineos	77,52	54,73	63,07	91,76	73,82	81,07
Mastín español	83,02	54,66	70,11	94,68	73,08	86,29
Perdiguero de Burgos	75,77	62,70	66,43	90,67	79,83	83,37
Galgo español	82,06	61,21	68,48	93,10	75,18	82,16
Sabueso español	78,94	56,65	65,13	92,65	75,38	82,62
Ca de bestiar	72,02	50,77	58,59	88,55	69,76	77,22
Podenco ibicenco	76,05	56,78	65,00	90,88	74,86	82,38
Podenco canario	75,94	62,61	64,80	91,16	80,87	82,91
Podenco ibérico	80,31	64,31	72,24	93,32	81,90	88,00
Probabilidad promedio	78,29	58,80	66,47	92,07	76,61	83,30

(A) Probabilidad combinada cuando se analizan los once sistemas polimórficos. (B) Probabilidad combinada cuando se analizan los cinco sistemas detectables mediante electroforesis bidimensional (Pi-1, α 1-B, Prt-1 y Pa-1). (C) Probabilidad combinada cuando se realiza electroforesis bidimensional (opción B) y además electroforesis en gel de poliacrilamida que nos detecta el sistema Transferrina.

mayor posible. En la Tabla 3, se dan las probabilidades combinadas de exclusión en los casos de falsas filiaciones, utilizando:

- Los once sistemas polimórficos.
- Los cinco sistemas detectables a partir de una sola técnica, la electroforesis bidimensional en gel de agarosa-poliacrilamida (Pi-1, α 1B, Pa-1, Prt-1 y Prt-2).
- Además de la electroforesis bidimensional, la electroforesis en gel de poliacrilamida, que nos permite detectar el sistema Transferrina (Tf).

De las tres opciones, creemos más adecuada la tercera, ya que el sistema Tf aporta una información sustancial en la mayoría de las razas, y aunque el gel de poliacrilamida sólo nos sirva para detectar un nuevo sistema en relación a la electroforesis bidimensional, es importante señalar que al poderse visualizar perfectamente los sistemas α 1B y Pi-1, dispondríamos de un doble control para dichos loci. Otra ventaja adicional sería la técnica común de tinción que poseen los seis sistemas en cuestión, rápida y relativamente económica. La probabilidad promedio, para el conjunto de las diez razas, de detectar una filiación incorrecta se sitúa en torno al 66,47%, oscilando entre unos valores que van del 58,59% para la raza Ca de Bestiar hasta el 72,24% para Podenco Ibérico, en el caso de que sólo dispon-

gamos de un individuo por camada. Si se pueden analizar cinco descendientes por camada, dicha probabilidad se incrementa hasta el 83,30%, con unos valores extremos del 77,22% para Ca de Bestiar y del 88,00% para Podenco Ibérico.

Utilizando todos los sistemas disponibles, resulta obvio que la probabilidad de detección aumenta. Si sólo disponemos de un único descendiente, la probabilidad promedio se sitúa en torno al 78,29% (72,02% para Ca de Bestiar y 83,02% para Mastín Español), y utilizando cinco descendientes se eleva hasta un 92,07% (88,55% para Ca de Bestiar y 94,68% para Mastín Español). Sin embargo, los cinco sistemas no incluidos en la opción C (Sod, Lap, MPI, Alb y Pep-D), requieren la utilización de una nueva técnica electroforética -electroforesis en gel de almidón-, y cada sistema su propia técnica específica tanto a nivel de corrido electroforético como a nivel de tinción, lo que encarece de manera apreciable los costes. Además, sólo dos sistemas, Albúmina (Alb) y Manosa fosfato isomerasa (MPI) parecen aportar de manera apreciable suficiente información para que pudieran ser tomados en cuenta, aunque en el sistema MPI se añade un inconveniente adicional, al ser sólo dicho sistema detectable en las células blancas de la sangre, lo que implicaría una diferente, más pre-

156 cisa y costosa recogida de muestras, así como una distinta metodología laboratorial para el procesado y almacenaje de dichas muestras.

Como comentario final destacar la importancia que podría tener la creación de un "Centro de Identificación y Verificación de Pedigrees Caninos". Identificación genética de cada uno de los animales en los registros de los futuros Libros Genealógicos y verificación, en su caso, de posibles paternidades aducidas, principalmente para reproductores de gran valor.

AGRADECIMIENTOS

A Gallina Blanca Purina, por la concesión de una ayuda, obtenida en el I Gran Premio Purina 1985, con la cual se financió parcialmente la puesta en marcha de la Tesis Doctoral titulada "Relaciones Genéticas en Cánidos Españoles".

BIBLIOGRAFIA

- 1 Gerard, Ch.; Braun, J. P.; Darre, R.; Rico, A. G.: Controle de filiation chez le chien: Utilisation pratique des albumines et post-albuminez chez le colley. *Rec. Méd. Vét.*, **163**, 12, 1139-1141 (1979).
- 2 Gundel, H.; Reetz, I.: Exclusion probabilities obtainable by biochemical polymorphisms in dogs. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, **12**, 123-132 (1981).
- 3 Jamieson, A.: The genetics of transferrins in cattle. *Heredity*, **20**, 419-441 (1965).
- 4 Jordana, J.: Relaciones genéticas en cánidos españoles. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona (1989).
- 5 Reetz, I.: Zur Frage der Elternschaftskontrolle bei deutschen Hunderassen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **88**, 5-8 (1981).
- 6 Wiener, A. S.; Lederer, M.; Polayes, S. H.: Studies in isohemagglutination. IV. On the chances of proving nonpaternity; with special reference to blood groups. *J. Immun.*, **19**, 259-282 (1930).