

Control de paternidad y Pedigrí Genético: Situación Actual en la especie canina

Javier Cañón, David Parra, Susana Dunner

Laboratorio de Genética. Facultad de Veterinaria. UCM

Enero-2002

La utilización del ADN como método de identificación individual tiene una serie de aplicaciones que vamos a comentar a continuación. Si embargo, también existen una serie de limitaciones que es conveniente tener en cuenta con el fin de establecer el marco operativo.

El primer paso para disponer de marcadores de ADN en una especie es el desarrollo de lo que genéricamente se suele llamar el proyecto genoma. Recientemente, bajo el título *A canine linkage map: 39 linkage groups* se ha publicado un mapa de marcadores canino de baja resolución en una revista de genética animal (*Journal of Animal Breeding and Genetics*, **118** (2001), 3-19). Este mapa incluye 187 genes, con una distancia media entre ellos de 8,9 cM, asignados a 39 grupos de ligamiento que cubren casi la totalidad del genoma canino. Dentro de los datos presentados en la publicación se incluyen 85 genes nuevos. Este trabajo se ha llevado a cabo analizando un conjunto de familias de referencia del International DogMap que están constituidas por 129 perros de las razas Beagle y Pastor Alemán. Han participado 14 equipos de investigación de Norteamérica y Europa, incluido un equipo español que pertenece al Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria de Madrid (S. Dunner y D. Parra).

El genoma canino consta actualmente de unos 700 marcadores del tipo microsatélite y más de 200 genes que dan lugar a productos concretos.

La disponibilidad de un mapa de marcadores canino de baja resolución constituye una importante herramienta para futuros avances en el análisis genético de las razas caninas, así como para el control y reducción de la frecuencia de enfermedades hereditarias.

Aplicaciones más importantes

En el contexto de esta presentación las aplicaciones más importantes serían las relacionadas con la identificación individual y con la contrastación de la veracidad de los pedigrees.

Identificación individual

Los aspectos relacionados con la identificación individual se refieren a la posibilidad de identificar de una manera inequívoca a cada uno de los individuos de una población a lo largo de toda su vida, incluso de los rastros biológicos dejados por ese individuo, lo que se denomina trazabilidad.

La identificación individual mediante estas herramientas presenta una serie de ventajas respecto a cualquier otra de las que se vienen utilizando, como son el microchip o el tatuaje. La identificación individual mediante la huella genética se puede hacer de una manera sencilla a partir de cualquier célula nucleada del individuo de que se trate y el único elemento de control es la garantía de origen de la muestra. Obtenida la huella genética del individuo estará identificado para toda la vida incluidas actividades en las que deje un rastro de células con material genético como, por ejemplo, descendientes de ese individuo.

El conjunto de marcadores a utilizar debe garantizar un poder o capacidad de

discriminación suficiente que dependerá de la población de referencia. Esta capacidad de discriminación está relacionada con la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la población de referencia tengan un mismo genotipo. Valores entre 10^{-5} y 10^{-14} serían recomendados dependiendo del tamaño de la población que estemos tratando. Estos valores de discriminación pueden ser logrados por un conjunto variable, entre 8 y 15, de marcadores del tipo microsatélite, dependiendo de la población de referencia (de la raza de que se trate por ejemplo) y del conjunto de marcadores con el que se está trabajando.

Control de filiación o control genalógico

Una de las principales aplicaciones de la disponibilidad de la huella genética de los individuos es la posibilidad de llevar a cabo análisis de parentescos.

En principio habría dos tipos de análisis de interés: a) el análisis de exclusión de paternidad, el más frecuentemente demandado, b) la asignación de paternidad o, en general, la asignación de parentesco, cada vez más demandado.

El análisis de exclusión de paternidad lo que hace es comprobar que la composición genética de un descendiente es compatible con los padres teóricos. La herencia mendeliana de los marcadores del tipo microsatélite garantiza que los dos alelos de que es portador un hijo deben provenir necesariamente de cada uno de sus dos padres. De esta manera, en el caso de que un hijo sea portador de alelos no encontrados en ninguno de los hipotéticos padres descartan la veracidad de ese pedigrí.

La potencia de exclusión, es decir, el porcentaje de falsos padres detectados como tales, depende de la capacidad de discriminación del conjunto de marcadores que utilizamos y debería de ser superior al 99 %, lo que indicaría que de cada 100 falsos padres que llegaran a analizar a nuestro laboratorio sólo en un caso lo daríamos como si fuera compatible, es decir, un padre verdadero. Lograr estos resultados de potencia de exclusión depende, como en el caso anterior, de la población de referencia y requiere un número variable de marcadores entre 8 y 15 aproximadamente.

La asignación de paternidad o de parentesco es, a diferencia de la exclusión, un análisis probabilístico. La exclusión de paternidad es una prueba categórica en el sentido de que, descartados errores de laboratorio, si un hijo no es compatible con unos genotipos de los hipotéticos padres su filiación es falsa. Sin embargo, en el caso de la asignación de paternidad el problema es diferente ya que dentro del conjunto de individuos posibles padre con genotipo compatible con un descendiente sólo uno de ellos será el verdadero padre.

Cada vez es más frecuente en nuestros laboratorios la demanda de este otro tipo de análisis dentro de los cuales cabe multitud de situaciones. Concretamente en nuestro laboratorio hemos tenido que desarrollar herramientas estadísticas específicas para contrastar hipótesis menos tradicionales, por ejemplo, de que dos individuos son o no hermanos de padre y madre o de que dos individuos son medio hermanos, en ambos casos cuando no se dispone de muestras de ninguno de los posibles padres.

Para este tipo de análisis las necesidades de marcadores dependen, además de los mismos factores que en los casos anteriores, del tipo de parentesco a demostrar. Así, por ejemplo, probar la hipótesis de que dos individuos son hermanos de padre y madre puede llevarse a cabo con un conjunto de 10-15 marcadores. Sin embargo, si lo que queremos probar es la hipótesis de que se trata de medios hermanos necesitaríamos un mayor número de marcadores, 20-30, que hace más costoso el análisis.

Factores limitantes y dificultades

Muy brevemente nos vamos a referir a algunos aspectos que pueden dar lugar a dificultades de interpretación, a niveles de exigencia inferiores a los teóricamente aceptados, así como a la posibilidad de intercambiar información entre instituciones.

Para la exclusión de paternidad sería suficiente que el supuesto hijo fuera incompatible para un único marcador, sin embargo esta interpretación no tiene en cuenta la posibilidad de mutaciones en los marcadores. Mutaciones en este tipo de marcador son relativamente frecuentes, con valores entre 10^{-2} y 10^{-5} , por lo que un laboratorio con un volumen elevado de genotipados se encontrará con este problema con cierta frecuencia. Aunque es sabido que los microsatélites en los que el motivo de repetición es de 4 bases tienden a tener una tasa de mutación más elevada que aquellos en los que el motivo está constituido por dos bases, existe muy escasa información sobre las tasas de mutación de los microsátélites que se utilizan en la especie canina. Este mismo problema puede surgir ante la presencia de lo que se denominan alelos nulos.

Por esta razón sería prudente, cuando aparece una incompatibilidad en un único marcador disponer de una batería adicional de marcadores que pudiera confirmar o rechazar la incompatibilidad.

La capacidad de discriminación o la potencia de exclusión son los valores que proporcionan credibilidad a este tipo de análisis y de los que, en definitiva, depende el coste de genotipado. Según hemos visto en la introducción, el número de marcadores disponible actualmente en la especie canina supera enormemente las necesidades de las aplicaciones que venimos comentando, por lo tanto la cuestión es elegir un conjunto de marcadores cuya relación coste/beneficio sea aceptable. En términos generales se suele hablar de potencias de exclusión superiores al 99 % o de probabilidades de coincidencia inferiores a 10^{-10} , lograr estos valores es siempre posible, la cuestión es el número que se requiere cuando se trata de una población concreta. Es fácil darse cuenta de que no es lo mismo trabajar con una población grande, en la que los animales tengan un reducido nivel de consanguinidad o parecido genético, que trabajar con una población relativamente reducida en la que el nivel de endogamia sea elevado. En el primer caso es posible cumplir los objetivos con 8 marcadores, mientras que en el segundo es posible que fueran necesarios 15 marcadores para lograr los mismos objetivos. Por eso es necesario disponer de un margen de confianza suficiente para que en las poblaciones más desfavorecidas obtengamos unos parámetros relativamente aceptables, con potencias de exclusión no inferiores, por ejemplo, a un 95 %. De todas formas, dado el escaso conocimiento del comportamiento genético de la mayoría de las razas caninas siempre será muy aventurado garantizar *a priori* unos valores determinados de capacidad de discriminación. Sólo cuando un conjunto suficiente de animales de cada una de las razas sea analizado podremos estar en condiciones de hablar con una mayor precisión.

Aún en estas condiciones no todo está resuelto ya que no siempre será fácil disponer de una buena información de todas las posibles poblaciones de referencia. En muchas ocasiones lo que se nos solicita es contrastar la paternidad de individuos que pertenecen a determinadas familias o líneas de una determinada raza. En estos casos, aunque dispongamos de buena información en el ámbito de la raza es evidente que la información relevante, es decir, la población de referencia, en este caso sería la familia o línea y no la raza, por lo que la capacidad de discriminación del conjunto de marcadores se puede ver enormemente reducida y el porcentaje de falsos negativos muy superior al deseado.

Otro de los problemas que actualmente tenemos que enfrentar los laboratorios es la

ausencia de un conjunto consensuado de marcadores a utilizar por todos, incluso laboratorios que podemos estar utilizando los mismos marcadores producimos información no directamente intercambiable. Si este problema no es especialmente conflictivo para que diferentes laboratorios puedan dar garantías sobre la veracidad de un pedigrí, sí representa un gran inconveniente cuando se trata de contribuir con identificaciones genéticas individuales a una base de datos única de alguna sociedad o club canino.

En el 27 congreso del **ISAG (International Society of Animal Genetics)** celebrado en Minnessota (EEUU) en el año 2000, en el workshop dedicado a la especie canina, propusimos la creación de un Dog Parentage Comitee, una lista de 14 marcadores en un primer panel y de 10 en un segundo panel. Sin embargo, a día de hoy no se ha concretado definitivamente nada, de tal manera que el conjunto de marcadores que utiliza el Animal Health Trust del Reino Unido difiere del que utilizan el American Kennel Club (AKC) y el United Kennel Club de EEUU o del nuestro propio. No existe, por lo tanto, una forma unificada de presentar la información del genotipo del individuo y no se resulta posible, a la vista de las documentaciones que pueden presentar los diferentes organismos o asociaciones que utilizan este sistema de identificación, tratar de contrastar la veracidad de lo que allí se refleja.

Actualmente está en marcha, organizado por el ISAG, la primera prueba que se lleva a cabo internacionalmente para la coordinación del control de paternidad en esta especie y cuyos resultados serán presentados durante el mes de Agosto en Göttingen (Alemania).

El ejemplo del *American Kennel Club*

En el AKC (www.akc.org), el programa comienza en 1998 con el *DNA Certification Program* que había empezado como un programa piloto en 1996. En 1998 ponen en funcionamiento el programa *Compliance Audit Program*, utilizando un muestreo aleatorio, analizan 16.000 de un total de 3600 criadores. El resultado fue que el 88 % de las camadas estaban registradas correctamente.

Con el *Parent Club DNA program*, se recogen de manera voluntaria muestras en certámenes cuando aparecen la triada padre-madre e hijo, y de 1000 muestras tomadas, se probó que todos los perros estaban registrados correctamente.

Desde 1998, se requiere certificado de ADN de todos los perros de los que se va a extraer semen para refrigerar o congelar (o en aquellos casos en que se use la inseminación, siempre que el perro-padre no esté delante en la inseminación). El dueño posteriormente recibe el certificado, que servirá para determinar el correcto padre de una camada antes de registrarla, así como cuando la hembra es expuesta a varios machos en una sesión.

EL AKC ha aprobado un programa de ADN para sementales que se usan frecuentemente, previo al registro de sus próximas camadas, para aquellos machos con 6 o mas camadas registradas y aquellos que produzcan tres o mas camadas en un año de calendario. Se calcula que en un primer año serán 90.000 muestras y se conseguirá que muchos criadores comiencen de forma voluntaria el programa de verificación de parentesco. En principio es más útil gastar el dinero en animales que van a criar. El objetivo es tener los perfiles de ADN de todos los machos y hembras y de su descendencia cuando o antes de que emparenten.

El *DNA parentage certificate*, es nuevo y lleva el genotipo de sus padres indicando que su parentesco ha sido verificado. El perro debe haber nacido después del 1 de enero de 2000, ser registrado en el AKC e identificado genéticamente, así como su padre y su madre.

Además existe un servicio de evaluación de Parentesco, que provee una tabla de

evaluación de parentesco y un informe por escrito de la camada. Esta evaluación se basa en genotipos del archivo del AKC del Parent breed Club Program o del DNA Certification Program.

Los animales pueden tener dos 'status': DNA-P (DNA profiled), y DNA-VIP (DNA verified identity parentage).