

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA POR
MICROSATÉLITES A PERROS DE RAZA GRAN
DANÉS EN MÉXICO.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARIANA LAURA HERRÁN AGUIRRE

TUTOR:

MARIO PÉREZ MARTÍNEZ

COMITÉ TUTORAL
CARLOS ESQUIVEL LACROIX
SALVADOR ROMO GARCÍA

MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

- A Mis padres
Una vez no tengo más que palabras para agradecerles por siempre apoyarme incondicionalmente, brindándome todo su cariño y su fortaleza. No existe mayor orgullo para mí que el de ser su hija.
- A mis Hermanos
Alex y Jorge
Por ser mi meta y hacer que me esfuerce día a día, enseñándome a ser mejor.
- A Mis amigos
Gracias, por haber permanecido y llegado cuando todo mundo se había retirado, por ser una guía en los momentos más oscuros.
- A mi pareja
José Luis
Ser el astro incondicional que guía mi cielo, por ser el cerezo inmortal de cada primavera, Gracias amor.
- A mis hijos
Los sueños se crean de ilusión y esperanza, por ser la razón de esforzarme día a día y salir adelante. Por ser la luz que alimenta cada día mi corazón.
- Al Gran y hermoso
Belle
Por que tu presencia es importante para el mundo, gracias por inspirarnos. Ya que gracias a ti he hecho una amistad de oro.
- A Mamá Cuca
Gracias por estar siempre a mi lado, por cuidar de mi y mi familia... tu recuerdo por siempre vivirá conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Maria del Roció Gómez Ortega, por tu paciencia, conocimientos, guía y apoyo en la realización de esta tesis.

A la Dr. Carla Santana Torres y al Dr. Gino Noris García, por su apoyo y por transmitirme sus conocimientos.

Al **laboratorio de Biología Molecular Diagnostica BIMODI**.

Dr. Carlos Esquivel Lacroix, por su apoyo y consejos.

Al **Club Mexicano del Dogo Alemán y a los Criadores de Gran Danés en México**.

Francisco y Enid, gracias por todo su apoyo y sus consejos.

Al Dr. Mario Pérez Martínez, por tus apoyo y confianza para la realización de este trabajo.

Dr. Salvador Romo García y al Dr. Rogelio A. Alonso Morales por sus consejos y apoyo.

RESUMEN

En los últimos 20 años, las herramientas moleculares han permitido el estudio de la genética de las especies animales domésticas.

Con la reciente secuenciación del genoma canino, las herramientas de la biología molecular han sido utilizadas para el análisis, comprensión y entendimiento de las enfermedades monogénicas, sin embargo no se ha aprovechado en aplicaciones como la crianza selectiva, la cual se ve altamente beneficiada, así como los análisis genéticos poblacionales; los que se han enfocado en la determinación de linajes, sin contar con que a partir de los mismos, se pueden crear sistemas de reforzamiento de las enfermedades hereditarias.

En el presente trabajo, se estudiaron las bases genéticas de la raza Gran Danés, basados en la imperante necesidad de comprender la genética que cada variedad fenotípica (Americana y Europea), al tiempo que se validó la aparición de la nueva variante Criolla Mexicana (obtenida de la cruce de las variedades Americana y Europea), así como el estudio de una población externa y de un criadero comercial (Herrán Aguirre). Para esto, se empleó un conjunto de marcadores hipervariables tipo microsatélites, que permitieron determinar las frecuencias alélicas y genotípicas, además de los cálculos de estadística poblacional descriptiva, forense y de paternidad; dando origen al primer trabajo internacional de la raza en esta índole, lo que permitió validar a la variante Criolla Mexicana como una variedad genéticamente definida.

Palabras Claves: Gran Danés, Variabilidad Genética, Microsatélites, variedad Criolla Mexicana, Genética de Poblaciones

ABSTRACT

In the past twenty years, molecular tools have enabled the study and analysis on domestic species, starting with applications in agriculture, but leaving small animal applications aside.

With the recent emergence of the canine genome sequencing, the molecular biology tools have been used for the analysis, comprehension and understanding of monogenic diseases, however it has not been used in applications such as selective breeding, which is highly benefited and population genetic analysis, those who have engaged only in the identification of lineages, not to mention that from the same, you can create reinforcement system of hereditary diseases.

In this work, we established the genetic basis of the Great Dane breed, based on the imperative need to understand the genetics of each phenotypic variety (American and European), while we validate the emergence of new variant the Mexican Creole (obtained of crosses between American and European varieties), and the study of a foreign population and a commercial kennel (Herrán Aguirre). For this, we used a set of hypervariable microsatellite markers, which allowed us to determine allelic and genotypic frequencies in addition to descriptive population statistics calculations, forensic and paternity. Becoming the first international work in this breed, validate the Mexican Creole variant as genetically defined.

Key words: Great Dane, Genetic variability, Microsatellite, the Mexican Creole variety, Population Genetics

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Antecedentes genéticos de la raza Gran Danés | 2 |
| 1.1.1 Los Antiguos perros Asirios | 2 |
| 1.1.2 Los perros de la Edad Media..... | 4 |
| 1.1.3 Historia del Gran Danés durante el siglo XIX..... | 4 |
| 1.2 Diferencias fenotípicas de la raza | 7 |
| 1.2.1 Variedad Europea..... | 8 |
| 1.2.2 Variedad Americana..... | 8 |
| 1.3 Problemas actuales de la raza..... | 12 |
| 1.4 Marcadores moleculares | 13 |
| 1.4.1 Polimorfismos tipo Microsatélite..... | 14 |
| 1.4.2 Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa | 15 |
| 1.4.3 Electroforesis Capilar..... | 16 |
| 1.5 Genética de poblaciones | 17 |
| 1.6 Estructura Genética de los perros..... | 21 |
| 2 PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA | 22 |
| 3 JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 4 HIPÓTESIS | 23 |
| 5 OBJETIVOS..... | 24 |
| 5.1 Objetivos generales..... | 24 |
| 5.2 Objetivos específicos | 24 |
| 6 MATERIAL Y MÉTODOS | 24 |
| 6.1 Población..... | 25 |
| 6.2 Criterios de selección..... | 25 |
| 6.3 Obtención de muestras de sangre | 26 |
| 6.3.1 Extracción de material genético | 26 |
| 6.3.1.1 Lisis con Proteinasa K..... | 27 |
| 6.3.1.2 Adsorción a la membrana QIAamp..... | 27 |
| 6.3.1.3 Eliminación de residuos contaminantes | 27 |
| 6.3.1.4 Elución de los ácidos nucleicos puros | 28 |
| 6.4 Cuantificación de material genético..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 6.4.1 Protocolo Quant-iT | 29 |
| 6.5 Genotipificación..... | 30 |
| 6.5.1 Ampliación de los fragmentos | 30 |
| 6.5.2 Ampliación por Reacción en cadena de la Polimerasa | 31 |
| 6.5.3 Electroforesis Capilar..... | 32 |
| 6.5.4 Análisis estadístico genético..... | 33 |
| 7 RESULTADOS | 36 |
| 8 DISCUSIÓN | 60 |
| 9 CONCLUSIONES | 67 |
| 10 PERSPECTIVAS | 69 |
| 11 REFERENCIAS | 70 |
| ANEXOS..... | 76 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1.- Comparación de las características fenotípicas de los estándares oficiales de Estados Unidos (AKC) y Europa (FCI) para la raza Gran Danés variedades Americana y Europea. | 9 |
| Cuadro 2.- Clasificación de los polimorfismos microsatélite, con base en el tipo de repetidas..... | 14 |
| Cuadro 3.- Cuadro de Registro de Identificación de cada uno de los ejemplares..... | 26 |
| Cuadro 4.- Loci utilizados en la amplificación de los marcadores caninos del kit de paternidad..... | 30 |
| Cuadro 5.- Ingredientes utilizados en la reacción de la amplificación de los fragmentos por PCR..... | 32 |
| Cuadro 6.- Condiciones para la amplificación de los fragmentos por PCR..... | 32 |
| Cuadro 7.- Condiciones de separación para los fragmentos de los Loci en caninos..... | 33 |
| Cuadro 8.- Frecuencias alélicas, estadística descriptiva, forense y de paternidad de los 10 loci estudiados en las tres variedades de Gran Danés | 40 |
| Cuadro 9.- Número de Alelos encontrados por Locus en las variedades y poblaciones estudiadas..... | 36 |
| Cuadro 10.- Heterocigotos Observados Ho, Heterocigotos Esperados Hs, Fis y valores de los Heterocigotos de cada locus en cada una de las variedades y poblaciones estudiadas | 41 |
| Cuadro 11.- Comparación entre los alelos más frecuentes en las tres variedades de la raza Gran Danés | 38 |

| | |
|---|----|
| Cuadro 12.- Resumen de los índices de estadística forense y de paternidad para los diez 10 loci en las tres variedades de la raza Gran Danés..... | 43 |
| Cuadro 13.- Comparación de las frecuencias genotípicas entre las tres variedades de la raza Gran Danés | 47 |
| Cuadro 14.- Desequilibrio genotípico de los 10 loci estudiados para las tres variedades de la raza Gran Danés | 48 |
| Cuadro 15.- Estadística genética descriptiva para las poblaciones del criadero y externa..... | 55 |
| Cuadro 16.- Distancias Genéticas (F_{st}) entre las variedades Genéticas del Gran Danés | 52 |
| Cuadro 17.- Análisis de diferenciación poblacional entre la variedad Criolla <i>vs</i> las variedades Americana y Europea | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.-Protocolo de QIAamp Mini kit para extracción de material genético por el método del <i>QIAamp DNA Mini Kit</i> y <i>QiAamp DNA Blood Mini Kit</i> . Ilustración tomada el manual original del mini Kit | 28 |
| Figura 2.- Metodología detallada para la preparación de muestras y calibración del fluorómetro de Qubit®, que permite la cuantificación del material genético. Imagen tomada del manual de fluorometría. (fluorómetro Qubit® de Invitrogen, 2009)..... | 29 |
| Figura 3.- Electroferograma de los productos de la PCR múltiplex, representando los genotipos de los diez microsatélites | 31 |
| Figura 4.- Frecuencias de distribución Alélica significativas que presentaron diferencias significativas en las tres variedades de la raza Gran Danés..... | 39 |
| Figura 5.- Frecuencias de distribución Genotípica significativas que presentaron diferencias significativas en los loci de las tres variedades de la raza Gran Danés..... | 46 |
| Figura .6- Representación de la estructura genética mediante gráficos de barras y de triángulo..... | 50 |
| Figura 7.- Análisis de componentes Factoriales de la tres variedades genéticas de la raza Gran Danés..... | 51 |
| Figura 8.- Árbol Filogenético de las tres variedades de la raza Gran Danés..... | 52 |
| Figura 9.- Frecuencias de distribución alélica significativas de los diez loci estudiados en las poblaciones del Criadero y Externa. | 54 |
| Figura 10.- Frecuencias de distribución genotípica significativas de los diez loci estudiados en las poblaciones del Criadero y Externa..... | 58 |
| Figura 11.- Árbol filogenético de las variedades y poblaciones estudiadas..... | 59 |

1. INTRODUCCION

Las razas son definidas como grupos en que se subdividen algunas especies biológicas que comparten una serie de características que se transmiten por herencia. Las razas de perros molosos (grupo de perros caracterizados por tener una constitución musculosa, fuertes mandíbulas, gran cabeza y hocico corto) fueron originalmente desarrolladas a partir del *Canis indigenous* y exportadas a otros países o regiones geográficas. La crianza de estos animales, fue seleccionada de acuerdo a ciertos rasgos fenotípicos, tales como la talla, el color de pelaje, la estructura ósea y el comportamiento, entre otras. Así, las razas actuales son la evolución de las antiguas, las que han ido cambiando según se ha necesitado de nuevas características (Sargan, 2004).

Históricamente, todas las razas tienen como ancestro común al *Canis domesticus*, y fueron desarrolladas durante el siglo XIX, aunque los Galgos y los Chow Chow fueron creados recientemente (Irion et al., 2003). En la actualidad, el *Canis domesticus*, ha sido estratificado en aproximadamente en 400 razas puras o razas con *pedigree* según la Federación Cinológica Internacional (FCI), muchas de las cuales han sido mantenidas como subpoblaciones separadas genéticamente, y como consecuencia del aislamiento han presentado efectos negativos e indeseables. Aunque algunas mutaciones presentan características deseables; no obstante y a pesar de la alta vigilancia médica y del alto grado de investigación que existe, encontramos que el perro es una especie con más de 450 enfermedades genéticas, siendo sólo rebasado por el ser humano (Sargan, 2004).

Con el paso de los siglos, las razas caninas han sido diferenciadas en cuatro importantes grupos (Mastiff, Cimarrón, los perros Asiáticos y los perros de compañía), entre ellos el grupo de los Mastiff corresponde al ancestro genético del Gran Danés, cuyas

características destacables son su gran agudeza olfativa, así como su capacidad para caza mayor y menor (Becker, 2005).

En los últimos años, la biología molecular ha permitido el uso de herramientas genéticas para analizar a los perros, muchas de las cuales han sido empleadas en el análisis de linaje, así como en el estudio de enfermedades monogénicas (Ostrander and Kruglyak, 2000). A la fecha, y gracias al proyecto del genoma canino, los estudios han sido más detallados, debido al contenido de marcadores polimórficos presente en dicho genoma; entre ellos los marcadores tipo microsatélite (*Short Tandem Repeats*, STR) han sido una parte fundamental por lo que al mapeo genético se refiere y su participación ha sido de gran importancia en los estudios de asociación genética relacionados con enfermedades hereditarias (Boyko et al., 2009). No obstante, los STR no han mostrado resultados contundentes en cuanto a las asociaciones genéticas se refiere, pero constituyen la piedra angular de los estudios poblacionales, de tal suerte que varios grupos de investigación en el mundo han publicado resultados donde la aplicación de los STRs se ha utilizado con fines de diferenciación genética entre las diferentes razas caninas de manera exitosa (Fredholm and Wintero, 1995).

1.1 Antecedentes Genéticos de la raza Gran Danés

1.1.1 Los antiguos perros Asirios

En las excavaciones de los palacios y monumentos Asirios se ha encontrado evidencia de que la tribu predominante del oeste de Asia, tenía como acompañante a unos perros parecidos a los antiguos Gran Danés, descritos en los libros de registro de Alemania. Así, las paredes de muchas de sus estructuras arquitectónicas muestran imágenes de estos caninos ilustrando eventos especiales, de las cuales una de ellas procede del templo de Babilonia que fue construido doscientos años A.C. y reconstruido después por el gobernante Nebuchadnezzar (Ardanaz, 2008, Tarangano, 1996). En esta imagen

se representa a un hombre Asirio guiando a un poderoso perro, parecido al antiguo Gran Danés, el que portaba una correa torcida. Otra famosa imagen corresponde a una escena de cacería en la que se observa a este tipo de perros persiguiendo a dos caballos que fueron heridos por flecha; la representación de estos perros es diferente, ya que en esta escena los perros presentan un cuerpo mucho más refinado y con una estructura de alta elegancia. En la cabeza no presenta arrugas y sus orejas eran pequeñas, personificando a los perros de talla grande de compleción delgada utilizados para cacería rápida; por su parte, los ejemplares más pesados (molosos) no sólo se utilizaban para la cacería sino también para las peleas, asemejándose físicamente a los perros Tibetanos de la actualidad, quienes comparten ancestría con los actuales Daneses (Edward, 1987).

Se sabe que la cultura Romana por sus altos estándares de vida, se interesaron en la crianza de perros “pura sangre” para pelea, y también en perros delgados y ágiles para la cacería. Con estos propósitos los Romanos importaron perros Británicos que eran muy deseados en esa época. Algunos documentos narran que los perros importados eran tan grandes y fuertes que podían romper el cuello de un buey con su mordida; se cree que los ancestros de estos perros molosos fueron traídos por los Fenicios en el siglo VI A.C. y como resultado los descendientes de estos ejemplares fueron cruzados con perros nativos donde este tipo de raza se volvió muy famosa por su alta capacidad de trabajo. Gracias a su ferocidad y fuerza, los Romanos utilizaron esta raza para pelear en los circos, su fama fue tan amplia que el emperador decidió criar a los mejores especímenes para su recreación y uso. Así, los perros del Tibet y los molosos han sido de las razas más importantes de la historia de las razas molosas, de las cuales y sin lugar a duda los Mastiff fueron los antecesores de todos los perros europeos parecidos a los Gran Danés (Edward, 1987, Becker, 2005).

1.1.2 El Gran Danés en la Edad Media

Antiguas pinturas ilustran perros durante la caza, donde casi todos son descritos con pelaje rugoso, pero semblante parecido al Gran Danés actual. El pintor *Snyders* incluye dos tipos de perros en sus trabajos, el delgado para arrear las manadas, y el fuerte y musculoso que pelaba de frente contra los jabalíes. Los nobles europeos intentaban constantemente mejorar sus perros haciéndolos cada vez más pesados y fuertes, este nuevo tipo de raza se empezó a expandir por todos los continentes siendo descritos en historias y pinturas por otros países (Joan, 1994).

La conformación de los perros que se mantuvieron en las cortes empezó a cambiar con los años, volviendo sus colas largas y anilladas, con características más afiladas y menos molosas, aumentado su talla, con un pelaje mas liso, pero su cuerpo aun era fuerte y pesado. La última descripción de los perros de cacería de jabalíes fue guardada en el registro *Kurhessischen Jägerhof*, donde no solo se detalla la forma de cazar de los ejemplares, sino también la conformación física del cuerpo de estos animales así como su color de pelaje. La mayor parte de los ejemplares eran de pelaje amarillo o rojo amarillento, algunos eran tigrados con caras negras y muy pocos eran negros. En 1876 el último perro de esta raza fue vendido y se cree que fue en ese momento en que la misma raza desapareció por completo. Los herederos de estos perros son el Gran Danés y los perros de pelea, los que fueron creados en la edad media y en la actualidad son los antecesores pilar de la formación de muchas razas modernas (America, 2003, Joan, 1994, Edward, 1987).

1.1.3 Historia del Gran Danés durante el siglo XIX

No existe otra raza de perro cuyo nombre haya cambiado tantas veces como el Gran Danés, conocido como Grand Danois en Francia, Allano en Italia, Dogo Alemán en España, Great Dane en Estados Unidos de América y Latinoamérica, y “Deutsche Dogge” en Alemania; donde se

encuentran registros de que la palabra “Doggen” tiene sus orígenes en la palabra inglesa “Dogca”, la cual después se convirtió en Dog en inglés y holandés, pero en francés varió a Dogue (Dangerfield, 2002).

En el siglo XVI el Gran Danés era frecuentemente llamado Dogo Inglés. Cerca del año 1680, cuando estos perros eran criados en gran número en Alemania principalmente en las cortes, los más grandes y mejores daneses recibían el nombre de perros de cámara (Kammerhunde) y eran marcados por utilizar distintivos collares de oro y joyas preciosas. Los segundos mejores perros recibían el nombre de perros de compañía (Libhunde) y ellos utilizaban collares en terminaciones en plata. Todos los collares eran confeccionados con pieles y joyas. Años después existieron otros perros conocidos como los perros ingleses o cazadores de toros con el nombre alemán hatzrüde que después fue remplazado por una antigua palabra alemana fanghund que refiere a la forma de trabajo que realizaban los animales, al igual que los cazadores de osos (saupacker) o cazadores de jabalíes (boarhund) (Joan, 1994).

A pesar de las diferencias en los nombres, se puede seguir el camino que había tomado la antigua raza Gran Danés en sus primeros años en el deporte de Alemania. El primer perro alemán apareció en una exposición de perros en Hamburgo en 1863, donde se informó que muchos perros tipo Gran Danés participaron en ese evento. Estos perros fueron llamados *Dane Doggen* y a los que presentaban una forma más pesada se les dio el nombre de *Ulmer Doggen*. En el registro de razas de los concursos se sabe que el zar de Rusia compró dos de estos últimos daneses y en la siguiente exhibición de Hamburgo en 1869 aparecieron 15 *Dane Doggen* y 12 *Ulmer Doggen* algunos de los cuales eran importados de Rusia. A pesar del nombre, ninguno de estos perros tiene un origen Danés (Dinamarca), y todos estos pertenecían a ciudadanos de Hamburgo quienes los habían criado de las líneas de Berlín y del sur de Alemania. Para 1876 los jueces de *show* declararon que era imposible de separar perros de la

misma raza en diferentes clases como si pertenecieran a diferentes razas, por eso propusieron dar un solo nombre a toda la raza obteniendo el Gran Danés su nombre oficial y actual “Deutsche Doggen” (Ardanaz, 2008, Tarangano, 1996). Este nombre sin embargo, no pudo mantenerse y se crearon continuamente diferentes nombres. Hasta 1879 en una reunión, muchos criadores decidieron que los perros mas pesados deberían llamarse perros daneses y que los menos pesados deberían de volver a tener el nombre de *Ulmer Doggen*. Bajo esta misma decisión a los daneses que presentaban color tigrado se les refirió como perros lobos o *hatzrüde*, mientras que a los demás colores no se les hizo ninguna referencia especial (Becker, 2005, Edward, 1987). Durante ese tiempo los daneses blancos y negros fueron criados principalmente al sur de Alemania mientras que al norte se prefería el color azul, sin embargo treinta años después existían un mayor numero de criadores de arlequines al norte de Alemania. Desde el año 1880 a la fecha, el “*Deutsche Doggen*” volvió a ser el nombre oficial y su registro es mantenido por Alemania. No obstante, los amantes de la raza lo tradujeron a Gran Danés, dándole la denotación del Apolo de los perros en Italia, razón por la cual en este país se le conoce como *Allano*, mientras que en Francia se le conoce como *Grand Danois*, mientras que en 1892 los ingleses lo llamaban el Mastiff alemán y en Dinamarca fue conocido como el gran perro Danés. A la fecha, continúa existiendo una gran confusión y se sugiere llamar al Gran Danés por su nombre alemán, debido a que el famoso naturalista *Buffon* empleó el nombre *Grand Danois* el que abarcó a los perros con características fenotípicas de esta raza, así como a los lebreles (Joan, 1994; J Crowley, 1998). En 1874 el famoso criador alemán Max Hartenstein compró un Gran Danés al sur de Alemania y empezó una nueva era en la crianza de esta raza, siendo su primer ejemplar *Wurtemberg*, quien también fue conocido como *Bizco*, el cual se apareó con una hembra comprada en 1876 llamada *Bella*; de cuyas crías se tomó el formato del estándar racial que perdura hasta la fecha (Dangerfield, 1973).

A partir de este momento, Alemania conservaba los mejores ejemplares de la raza (1880-1890), sin embargo en 1887 en San Petersburgo Rusia, se observó por primera vez en una exposición la presencia de veintidós ejemplares de la raza Gran Danés; posteriormente en 1892, en el Internacional Dog Show, los jueces marcaron por primera vez la singularidad que existía en la misma raza, encontrando faltas notorias en los perros, como eran las espaldas curvas, belfos agrandados y cabezas puntiagudas; cerca de los 65 ejemplares que participaron fueron calificados como muy buenos llevando a interés que el ganador de la raza fue un perro tigrado importado de Rusia. Este record que fue escrito en el registro de la historia de la raza representó un estigma a los criadores alemanes quienes se jactaban desde 1882 de ser los únicos y mejores mantenedores de la raza (Joan, 1994, Ardanaz, 2008, Tarangano, 1996).

A través de los años el Gran Danés naturalmente encontró su camino para distribuirse a nivel mundial, actualmente muchos de estos ejemplares se encuentran en Estados Unidos de América, una vez que en 1936 se publicó en la lista de criadores al primer criador norteamericana de la raza (Joan, 1994).

Durante todo este tiempo el Gran Danés ha sido exhibido por sus características, que lo hacen ser un animal que les gusta a quienes desean tener ejemplares de gran estatura, noble comportamiento y fuertes características, aunque en realidad la propietaria del estándar y de la raza es Alemania (Dangerfield, 1973, Joan, 1994, Becker, 2005).

1.2 Diferencias fenotípicas de la raza

Como ocurre en otras razas, la apariencia general y la conformación física varían entre un Gran Danés criado en Europa en comparación con otro criado en América; esto es debido al conflicto de estándares creado por la FCI (Federación Cinológica Internacional) y la AKC

(American Kennel Club). Las variedades Europea y Americana del Gran Danés son muy similares y aunque cada una presenta aportaciones importantes a la raza, la realidad es que no hay un representante único de la misma, sino que la raza Gran Danés está representada por al menos dos variedades: Europea y Americana (Ardanaz, 2008).

1.2.1 Variedad Europea

Alemania y el resto de Europa han sido muy estrictos en cuanto a la crianza y selección de la raza, procurando un manejo reproductivo en el que se pretende mantener el equilibrio genético evitando los cruces consanguíneos. Pero han conservado un nivel de endogamia, evitando la transmisión de características y genes indeseables a la descendencia pero mantienen las características deseables de la raza, como: cabezas cuadradas y pesadas, belfos prominentes, cuellos y huesos anchos, cuerpos toscos y fuertes (molosos) para trabajo rudo, tamaño ideal entre los 85 cm a 90 cm de cruz, prefiriendo la rusticidad y fuerza, y sacrificando la estatura (Ardanaz, 2008).

1.2.2 Variedad Americana

Los ejemplares americanos poseen un cambio radical en su apariencia externa en comparación con los europeos. Esto se debe a que en Estados Unidos se rigen por otro estándar diferente al de Alemania. El rasgo más comparativo que presentan, así como la seña de identidad es la forma de la estructura de su cabeza, que en lugar de tener forma cuadrada y plana, son más rectangulares y triangulares, con un “*stop*” muy poco marcado y belfos que difieren mucho de los que se ven en Europa. En lo referente a su conformación física, son ágiles y fuertes pero menos molosos que los europeos, es decir más delgados, estéticos y elegantes en su mayoría, perdiendo la fuerza y rusticidad que normalmente se encuentran en los europeos (Ardanaz, 2008, Tarangano, 1996).

Eventualmente estas subrazas han sido reconocidas gracias a la separación física que existe entre ambos continentes, esto también se debe por la segregación de los estándares raciales que manejan las asociaciones, siendo Estados Unidos regido por el AKC, mientras que Europa, México y Latinoamérica por la FCI, por lo que se han creado diferencias significativas en cada uno de sus estándares (Cuadro 1) (Ardanaz, 2008, J Crowley, 1998).

México y Latinoamérica se ven influenciados por ambos estándares raciales, dando como origen a la alta importación de las dos variedades (Americanas y Europeas), incluso llegando a hacer cruza entre ellas, esto con el fin de obtener rasgos físicos de ambas variedades en un solo ejemplar, lo que en México se conoce como variedad Criolla, nombre que se le da al hijo de dos extranjeros nacidos en México. Esta nueva variedad ha tenido un fuerte impacto en la crianza de esta raza (Ardanaz, 2008)(AKC www.akc.org/breeds/great_dane/, FCI www.fci.be/nomenclature.aspx).

Cuadro 1.

Comparación de las características fenotípicas de los estándares oficiales de Estados Unidos (AKC) y Europa (FCI) para la raza Gran Danés variedades Americana y Europea (AKC www.akc.org/breeds/great_dane/, FCI www.fci.be/nomenclature.aspx)

| Estructura | Americana | Europeo |
|---------------------------|--|--|
| Apariencia General | Conformación general equilibrada, presentando notables diferencias entre machos y hembras | Conformación general, armoniosa, fuerte y expresiva, sin diferencias entre sexos. |
| Tamaño | Los machos deben ser mayores a la cruz 76.2 cm (30 pulgadas), mientras que las hembras a 71.12cm (28 pulgada). | Los machos deben medir al menos 80 cm a la cruz (32 pulgadas) y hembras 72 cm (29 pulgadas). |

| | | |
|-------------------|---|---|
| Tamaño | Los machos deben ser mayores a la cruz 76.2 cm (30 pulgadas), mientras que las hembras a 71.12cm (28 pulgada). | Los machos deben medir al menos 80 cm a la cruz (32 pulgadas) y hembras 72 cm (29 pulgadas). |
| Proporción | A las hembras se les permite tener un cuerpo más alargado. | La estructura debe ser cuadrada, mientras que la longitud del cuerpo debe ser igual a la altura a la cruz, sin rebasar 5% en machos y 10% en las hembras. |
| Cabeza | Tendrá forma rectangular, larga distinguida y expresiva. | En perfecta armonía con su apariencia general, debe ser larga, estrecha y bien definida, además de muy expresiva. |
| Hocico | Profundo (belfos colgantes no son deseables). | Profundo y posiblemente rectangular. Debe estar en proporción con la cabeza. Los bordes de los labios bien definidos y los labios pigmentados se oscurecen. |
| Nariz | Bien pigmentada. | Más ancha, centrada y pigmentada. |
| Dientes | Dentición completa, en mordida tipo tijera. | Mordida en tijera y completa. |
| Ojos | Deberán ser de tamaño mediano, con párpados definidos en forma de almendra y con gran desarrollo de las cejas. | Bastante grandes, preferentemente oscuros, en forma almendrada con párpados limpios. |
| Orejas | Inserción alta, de tamaño medio y de grosor moderado, doblada hacia adelante y caída cerca de la mejilla. Si está recortada, su longitud debe estar en proporción con el tamaño de la | De inserción alta, de tamaño medio. Los bordes frontales cuelgan junto a las mejillas. |

| | | |
|-------------------------|--|--|
| Línea dorsal | Los hombros tendrán una inserción limpia y deberá ser suave y r ecta, manteniéndose del lomo hasta la parte baja de la grupa. | Corta y firme, completamente en línea recta y c on una casi imperceptible caída en la grupa. |
| Frente | El pecho deberá ser ancho, profundo y bien musculoso, sin un esternón pronunciado. | El pecho debe llegar a los codos, las costillas deben estar bien formadas y a nguladas formando parte d e la l ínea dorsal. El frente debe ser amplio, profundo y bien proporcionado, con esternón marcado. |
| Patas delanteras | Vistas en forma lateral, deben ser fuertes y m usculosas. El hombro y el brazo deben medir lo mismo. El codo debe ser la mitad de la altura del perro al piso. Las manos compactas y redondas. | Fuertes y musculosas, el largo de la escápula debe ser del largo del brazo, con un ángulo de inclinación de 100° a 110° con el b raz o. Brazo debe ser un poco más largo que la escápula; los codos sin desviaciones, los pies redondos, bien arqueados con dedos bien juntos (pie de gato). |
| Grupa | Debe ser fuerte, amplia, muscular y bien angulada. | Anc h a , con fuerte musculatura, ligeramente caída desde el sacro hasta la inserción de la cola, con la cual se fusiona imperceptiblemente. |
| Patas traseras | La articulación del corvejón debe ser perfectamente recta y bien angulada, los corvejones no deben estar tornados ni hacia dentro ni hacia afuera. Las patas traseras deben ser compactas con dedos bien | Músculos fuertes en la grupa, caderas y m uslos con una apariencia ancha y redonda. Las patas bien anguladas y fuertes, paralelas entre ellas. Los pies redondos y bi en arqueados con dedos juntos |

1.3 Problemas actuales con la raza

Al igual que muchas otras razas, el Gran Danés se ve afectado por una gran variedad de problemas de salud, algunos de los cuales se cree que son de base hereditaria. Dentro de las afecciones más comunes e importantes de la raza esta la Displasia de Cadera (DC), enfermedad que puede ser hereditaria con multi-factores de expresión. Una de las enfermedades más comunes de índole autoinmune es el hipotiroidismo, que generalmente es el resultado de un trastorno hereditario del sistema inmunológico. Otra enfermedad menos conocida pero actualmente importante y que ha tenido aparición en los últimos años, es la enfermedad de Von Willebrand, un trastorno que causa sangrado (similar a la hemofilia en los humanos). Sin embargo, el problema más común dentro de esta raza son las cataratas, que a largo plazo pueden causar ceguera, ésta normalmente va acompañada de anormalidades de los párpados, como por ejemplo el entropión (Great Dane club of America, 2003).

El tema más conocido y controversial que se tiene en la investigación de enfermedades en esta raza es la miocardiopatía (DCM), que se sospecha sea una enfermedad hereditaria y tal vez ligada al sexo. Sin embargo el trastorno más severo y el más común por el que mueren 6 de cada diez perros daneses al año es la torsión gástrica, aunque actualmente no se conocen las razones por las cuales el estómago se distiende y tiene una tendencia a girar, cortando el suministro de sangre a diversas partes del cuerpo, por lo que es de elevada mortalidad (Great Dane club of America, 2003).

El Gran Danés no es una raza considerada como longeva, teniendo una expectativa de vida promedio de 7 a 10 años, aunque desafortunadamente con la vejez estos ejemplares se vuelven propensos a tumores como el osteosarcoma y el linfoma, siendo el cáncer la segunda causa principal de muerte en esta raza. Los problemas renales, fallas hepáticas, problemas de articulaciones como

son las artritis y en casos muy avanzados la presencia del Síndrome de Wobbler, son enfermedades que acortan aun más el tiempo de vida, a pesar de los eficientes cuidados y atenciones que se les puedan proporcionar (Great Dane club of America, 2003).

1.4 Marcadores moleculares

El genoma del perro está formado por cerca de 2.5 billones de pares de bases (bp), las cuales determinan la función biológica a nivel celular, tisular y sistémico. El estudio del genoma canino ha permitido incrementar notablemente el conocimiento de esta especie desde diferentes perspectivas, que van desde sus orígenes ancestrales, genética poblacional y recientemente estudios de asociación genética, basados en la variación de algunos marcadores, situación relacionada con algunos cambios fisiológicos que pueden manifestarse como una enfermedad (Gómez, 1998).

En las décadas pasadas se han logrado avances importantes en las metodologías para el estudio de la genética a nivel molecular, incrementando su impacto en la genética poblacional. Entre las más importantes se encuentran: El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la determinación de regiones hipervariables entre individuos, así como el advenimiento de la secuenciación automática (Gómez, 1998).

La genética molecular moderna y en particular el análisis del genoma canino han dado lugar a muchas novedades, entre las que se encuentran los marcadores moleculares de alta variabilidad que permiten determinar la diversidad genética entre individuos, pero también entre poblaciones. Dicha diversidad genética es producto de mutaciones que han sido fijadas en la población por fuerzas evolutivas como la selección natural y la deriva génica, por lo que se presentan en al menos el 1% de la población, razón por la cual se distinguen de las mutaciones y reciben el nombre de polimorfismos (Gómez, 1998).

1.4.1.- Polimorfismos tipo Microsatélite

Los microsatélites son secuencias cortas de repetición en tándem, cuya unidad de repetición se encuentra entre 1 y 6 pares de bases (bp), por lo que se les clasifica como mononucleótidos, cuyos representantes más comunes en el perro (*Cannis domesticus*) son las secuencias poli(A)/poli(T); los dinucleótidos, siendo los más comunes los CA/TG, los cuales ocurren hasta dos veces en frecuencia más que AT, y tres veces más que AG/TC; los trinucleótidos, entre los que se encuentran CAG y AAT como los más comunes; y los tetranucleótidos, los pentanucleótidos y hexanucleótidos que son los STR más estables (Cuadro 2)(Nielen et al., 2001, Galibert and Andre, 2008).

Cuadro 2

Clasificación de los polimorfismos microsatélite, con base en el tipo de repetidas

| | |
|-------------|-----------------------------|
| Puros | CACACACACACACAACACACACA |
| Compuestos | CACACACACACAGAGAGAAGAGAGA |
| Imperfectos | CACATTCACACATTCATTCATTCACAT |

Los STR se encuentran principalmente en los genomas de los mamíferos así como en los cloroplastos y se han clasificado como puros, compuestos e imperfectos (Gómez, 1998). Presentan tasas de mutación muy elevadas, comparadas con las tasas de mutación puntual. Por otra parte, se estima que a partir del análisis por pedigree en perros, esta frecuencia de mutación tan elevada permite que se encuentren muchas formas de uno de estos segmentos de DNA (ácido desoxiribonucleico, por sus siglas en inglés) en distintos cromosomas, las cuales se diferencian por el número de repeticiones. Así, un individuo heterocigoto tiene dos formas, por ejemplo 12 y 15,

las cuales representan 12 y 15 repetidas del motif microsatélite, mientras que un individuo homocigoto tiene una sola forma de repetida, por ejemplo 11, indicando que en ambas cromosomas existe 11 veces repetido el motif (Botstein et al., 1980, Nielen et al., 2001, Wayne and Ostrander, 2004).

Además del elevado polimorfismo que presentan los STR, otra gran ventaja es que en el genoma existe un gran número de loci, además de que cada uno de ellos genera una variación entre individuos por lo que pueden ser usados como marcadores genéticos (Gómez, 1998).

1.4.2 Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una forma alternativa de la clonación de secuencias, para aislar una secuencia específica de ADN de la cual se obtienen millones de copias. Este proceso se lleva a cabo en un termociclador, que realiza ciclos en tiempo y temperaturas programadas. La primera etapa del PCR se le denomina desnaturalización, donde la doble hélice del ADN se separa en dos hebras, para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas en un rango entre 93°C a 97°C; la re naturalización se producirá cuando la temperatura disminuya. El segundo paso se le conoce con el nombre de hibridación, donde los primers o cebadores se unen a las regiones 3' complementarias que franquean el fragmento que se desea amplificar, esto se realiza al bajar la temperatura en un rango entre los 50°C y 60°C. En la tercera etapa denominada elongación, se produce la síntesis de una cadena sencilla en la dirección 5' y 3', mediante la enzima ADN Polimerasa, la cual incorpora los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) presentes en el medio siguiendo la cadena molde, esto se realiza a una temperatura de 72°C. Una vez completado el primer ciclo disponemos de dos copias de la muestra original, al final del segundo ciclo contaremos con cuatro muestras, del tercero se obtendrán ocho muestras; si los ciclos se producen un número n de veces y suponiendo que el número de

copias de ADN se duplica en cada ciclo obtenemos un cantidad de ADN de $2n$, por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica. La detección del producto de la reacción en cadena de la polimerasa se realiza normalmente durante un corrido electroforético, dependiendo del tamaño de la amplificación.

1.4.3 Electroforesis Capilar

La electroforesis capilar (EC), es una técnica de separación de moléculas través de la movilidad de éstas por medio de un campo eléctrico (100 a 500 V/cm), la cual se encuentra basada en la migración diferencial (ADN, proteínas, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, fármacos, etc.). Esta técnica es utilizada comúnmente en el análisis de fragmentos de ADN con pesos moleculares muy parecidos, permitiendo la separación de cada alelo de acuerdo a sus pesos moleculares. (Magaña J. y Gómez R., 2009)

La electroforesis capilar constituye una adaptación de la técnica de electroforesis simple, solo que en la tira es remplazada por un capilar de diámetro de $50\mu\text{m}$, cuyo interior se encuentra formado por grupos silanol (Si-OH) que favorecen la presencia de analitos específicos; donde los cationes fluyen hacia la terminal negativa, mientras que los aniones fluyen hacia la positiva. La inducción del campo eléctrico hace que la separación se vuelva más sensible entre las diferentes moléculas, haciendo el tiempo de análisis más corto (Magaña J. y Gómez R., 2009).

En el caso del ADN, los fragmentos de análisis se encuentran adheridos a marcas fluorescentes que son detectadas por un láser de argón (Ar), que las excita a diferentes longitudes de onda; donde un detector que se encuentra ubicado en un extremo del capilar (cerca del compartimiento catódico) permite el análisis de múltiples fragmentos simultáneamente, los que se mueven por la aplicación del campo eléctrico hacia el polo positivo y se separan de acuerdo con la longitud del mismo. De tal manera que los alelos de menor peso

molecular viajan más rápido, mientras que los alelos de mayor peso molecular lo hacen más lentamente. La señal obtenida es la base del electroferograma, que muestra el registro de la composición de una muestra entre un individuo y otro, obteniendo identidad individual dentro de la misma especie (Magaña J. y Gómez R., 2009).

Estas características hacen, de la EC un método eficiente y económico por su capacidad de separar cientos de componentes de forma simultánea, empleando mínimas cantidades de muestras y reactivos, haciéndola la herramienta de primera elección en el análisis molecular de fragmentos.(Magaña J. y Gómez R., 2009)

1.5 Genética de poblaciones

La genética de poblaciones se encarga de estudiar la variabilidad genética y dinámica en las poblaciones. Esta disciplina está estrechamente relacionada con la genética evolutiva, ya que se encarga principalmente de estudiar los componentes genéticos de los individuos que integran a una población, la transmisión de estos genes de una generación a la otra y a partir de modelos matemáticos demuestra la actuación de éstos sobre la población (Gomez M. D.et al., 2009).

La diversidad genética ha sido un concepto principal dentro de la Biología, permitiendo entender los cambios que existen sobre los ecosistemas, así como la habilidad de algunas especies animales para adaptarse al medio ambiente. Sin embargo, la falta de diversidad es un problema de importancia, llevando a algunas especies al borde de la extinción. Bajo esta teoría se cree que las especies animales no domesticadas mantienen un complejo equilibrio entre ellas, el que puede verse afectado al ocurrir cambios dentro de su entorno, mientras que las especies domésticas tienen una tendencia al desequilibrio debido a la manipulación por las preferencias y necesidades de los productores. El empleo de los polimorfismos genéticos constituye hoy en día, uno de los métodos más eficientes en

el mapeo genético, así como en sus diferentes aplicaciones (Boyko et al., 2009):

- Estudio de poblaciones
- Identificación de individuos
- Estudios evolutivos y de migraciones
- Genética conservacional
- Aplicaciones forenses
- Epidemiología y asociaciones genéticas.

La genética poblacional es extremadamente compleja, ya que las poblaciones pueden presentar características que las hacen parecer diferentes, lo que podría sugerir que estas diferencias son genéticas, es decir, heredadas biológicamente. Sin embargo, estudios antropológicos han demostrado que las diferencias morfológicas entre los grupos involucran a la selección natural, aunque también es posible que el efecto se deba por lo menos en parte, al flujo genético con las poblaciones vecinas. Pero cualquiera que sea la influencia que se tenga sobre los individuos es lógico inferir que las razas no son puras y que las diferencias entre las mismas no son muy marcadas (Parker and Ostrander, 2005).

Gracias a la genética moderna aplicada a la teoría de la evolución, se han podido conocer cuatro factores evolutivos principales que pueden afectar a una población: la mutación, que produce los nuevos tipos genéticos; la selección natural, que elige a los que mejor se adaptan al ambiente en el que viven; la deriva génica, que es el efecto del azar debido a las fluctuaciones estadísticas de las frecuencias génicas de una generación a otra; y la migración, que involucra el transporte de genes de una población a otra o de un lugar a otro (Gómez, 1998, Parker and Ostrander, 2005).

Debido a que los intercambios migratorios (importaciones) que existen en las especies domesticas no han cesado, pero tampoco han sido lo suficientemente grandes como para crear una homogeneidad genética, hace posible que si dos poblaciones se encuentren muy próximas geográficamente (sobre todo allí donde las periferias se tocan o se mezclan) se espera una diversidad importante debida a los intercambios genéticos dados por la migración (importación). Sin embargo, en el caso de los intercambios genéticos muy prolongados con vecinos muy distintos, los genes también pueden ser reemplazados (Gómez, 1998).

En pocas palabras, el genoma de las razas de perros representa la mezcla de alelos heredados de múltiples poblaciones ancestrales, característica importante en el estudio de enfermedades ocasionadas por la incidencia de variaciones en más de un gen (enfermedades poligénicas), ya que en ocasiones, el análisis genético puede asociar azarosamente cualquier alelo que presente una alta frecuencia en una población con el padecimiento, lo que no indica que en realidad esté asociado con el fenotipo de la enfermedad (Gómez, 1998). Por lo tanto el estudio detallado de una población puede ayudar a reconocer si la variación es en buena medida de carácter fortuito, debida a la deriva génica, o resultado de una selección natural variable aleatoriamente, ya que las leyes del azar son bien conocidas y la posibilidad de examinar muchos genes nos ayuda a comprenderlo (Deschamps et al., 1992).

La mayoría de los principales problemas de salud se caracterizan por ser enfermedades multifactoriales y poligénicas, las cuales para su estudio requieren de nuevas estrategias genéticas que permitan la identificación de genes involucrados en el desarrollo de tales patologías. Es por ello que, en los estudios epidemiológicos resultan imprescindibles los estudios poblacionales abordados desde el punto de vista de la genética de poblaciones con el fin de validar las asociaciones entre los genes con las enfermedades. En este aspecto,

recientemente la genética poblacional ha confluído con el análisis estadístico generando datos con mayor confiabilidad, lo que llevará al perfeccionamiento de pruebas de susceptibilidad diagnóstica. No obstante, uno de los principales problemas para determinar con eficacia las asociaciones fenotipo-genotipo se inicia con los errores metodológicos debidos a la baja homogeneidad poblacional característica de las poblaciones mestizas, las cuales debido al alto grado de mestizaje ocasionan múltiples sesgos en el análisis genético, lo que se traduce en asociaciones erróneas (Gómez, 1998). Estas dificultades pueden ser eliminadas si se determina la estructura real de la población en estudio, así como si se establece la herencia ancestral, validando con ello los estudios de asociación conforme a las características específicas de una población y pudiendo así establecer la susceptibilidad a ciertas enfermedades, así como la respuesta específica a fármacos (Parker et al., 2007, Calboli et al., 2008, Parker et al., 2004, Gómez, 1998).

Finalmente, se cree que cada población canina presenta un patrón específico para los polimorfismos génicos, que la hace ser única. Esto nos hace inferir que no podemos emplear a un solo gen para reconstruir las características para un solo padecimiento, por lo que resulta importante considerar que algunos genes pueden estar sometidos a la acción de una fuerte selección natural. Hoy sabemos que el azar también puede influir en la evolución y por ende en las características poblacionales, ya que causa fluctuaciones típicamente inconstantes y caprichosas, que se resuelven estudiando un número suficiente de datos. Sin embargo, también puede ocurrir que ni siquiera el análisis de una gran cantidad de marcadores sea suficiente para el estudio de enfermedades genéticas, si al analizar todo el material que tenemos a nuestra disposición nos damos cuenta de que es heterogéneo y que puede descomponerse en partes que nos dan resultados distintos, en cuyo caso habría que explicar las diferencias. (Gómez, 1998, Pribanova et al., 2009).

El hecho de que una población tienda a la homogeneidad (población Africana en humanos) no significa que disminuya la variabilidad genética, sino al contrario, en una población homogénea todos los alelos (ancestrales) tienen la misma posibilidad de aparecer y sus frecuencias se encontrarán homogéneas, de no ser así esto puede deberse a otros aspectos como la asociación a una enfermedad (Gómez, 1998). Anexos 1

1.6 Estructura Genética de los perros

Desde la domesticación del lobo y la crianza de sus descendientes para ayudar al hombre con sus trabajos diarios, han creado una gran diversidad de razas. Existiendo actualmente más de 400 diferentes razas de perros, muchas de las cuales fueron creadas durante el siglo IX exceptuando algunas razas modernas. Actualmente existen dos organismos mundiales que controlan los estándares raciales de cada raza, la AKC (American Kennel Club) solo reconoce 152 de ellas como razas puras; mientras que la FCI (Federación Cinológica Internacional) reconoce 334 (Parker et al., 2004).

Siendo en 1997 el primer estudio realizado sobre los perros domésticos por Charles Vilá para conocer el origen de las razas domesticas empleando marcadores de ADN mitocondrial, pero no fue hasta el proyecto del genoma canino al principio de los años noventa que pretendía ayudar al estudio de las enfermedades genéticas que afectaban a los perros de raza pura, debido al sistema endogámico de crianza en los perros domesticos muchas de estas afecciones han afectado más del 80% de las razas puras en comparación con las razas mixtas que se estableció el uso de marcadores moleculares tipo microsatélite para el estudio genético de las razas de perros y su relación entre ellas (Parker et al., 2004).

La aplicación de estos nuevos recursos han exigido un mayor conocimiento sobre las razas, para poder ayudar a mejorar su manejo reproductivo como proteger la salud de cada una de ellas. (Parker y

Ostrander, 2005) Los marcadores moleculares tipo microsatélite se han vuelto una herramienta indispensable para poder estudiar y contestar muchas de las incógnitas e inquietudes de los investigadores como de los criadores y veterinarios. Hoy en día el Análisis de ADN se ha vuelto una poderosa herramienta para la identificación de individuos. Siendo utilizado principalmente en estudios Forenses en Humanos, creando paneles de marcadores moleculares tipo Microsatélite para la investigación de crímenes y la creación de bases de datos más especializados sobre las poblaciones. (Kanthaswamy et al, 2009) Siguiendo los pasos de la ciencia forense, se han creado paneles y kit similares para el estudio de las especies domesticas, principalmente utilizados en la industria agropecuaria, aunque su mayor industria se ha generado en las especies menores como ha sido en los perros domésticos, siendo los la especie animal que mayor contacto tiene con el ser humano. (Ostrander et al, 2005)

Actualmente en Estados Unidos de Norte América, muchas laboratorios han empezado a obtener lucro y provecho de estas herramientas, en usos básicos y simples como registro de ADN, pruebas de paternidad e incluso pruebas para conocer la ancestros genéticos de ejemplares no puros. (MetaMorphix Inc., 2007) Muchas de estas empresas utilizan marcadores ya estandarizados en kits comerciales, como es el kit de Dog StockMarks de Applied Biosystems. Siendo uno de los Kit comerciales más conocidos y utilizados (disponible en México) además de estar certificado por las dos grandes organizaciones Canófilas la AKC y la FCI (DeNise et al, 2004). Anexo 2

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en lo anterior y debido a la necesidad de contar con estudios genéticos sobre la raza Gran Danés y sus variedades (Americana, Criolla y Europea), así como las demás razas de perros y sus posibles variedades genéticas en el presente estudio se plantean los siguientes

problemas a resolver:

- Analizar la variación genética intra e inter variedad, así como determinar si cada variedad presenta una estructura poblacional genéticamente independiente.
- Realizar los cálculos de matemáticas forenses y de paternidad con el fin de verificar apropiadamente las relaciones de parentesco y el poder de discriminación y exclusión de este panel de marcadores tipo microsatélite del kit de paternidad de *Applied Biosystems* en la raza Gran Danés y sus variedades.
- Comparar genéticamente la población de un criadero comercial *vs* una población externa.
- Validar el uso del kit de paternidad StockMarks® Dog Genotyping Kit, y su utilidad en el estudio de genética poblacional de la raza y sus variedades (DeNise et al., 2004).

3 JUSTIFICACION

Los estudios de variabilidad genética y relación de parentesco a través de marcadores moleculares, han tenido en la actualidad una participación importante en la medicina veterinaria, contestando las incógnitas que se tienen sobre los orígenes de las razas y su relación entre ellas (Pribanova et al., 2009). Esto ha permitido que los criadores de algunas razas cuenten con la información genética que les permita validar sus sistemas de crianza; no obstante a la fecha la raza Gran Danés, así como sus variedades, carecen de este tipo de estudios a nivel mundial, razón por la cual resulta necesaria la descripción genética de la raza y la determinación genética de sus variedades.

4. HIPÓTESIS

El empleo de la genotipificación por ADN empleando microsatélites permitirá determinar los niveles de variabilidad genética presente en diversas poblaciones de perros de raza Gran Danés, así como de sus

variedades; al tiempo que permitirá distinguir genéticamente a cada una de las tres variedades descritas a la fecha. Así mismo, permitirá analizar y comprobar si la variabilidad genética de una población de un criadero comercial de la raza es mayor o menor a la de una población externa .

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos Generales:

Establecer a través del uso de microsatélites las frecuencia alélicas y genotípicas, que lleven a determinar la variabilidad genética que existe dentro de la raza Gran Danés en México en sus tres posibles variedades (Americana, Criolla y Europea), así como entre la población de un criadero comercial y una población externa.

5.2 Objetivos Específicos

1. Obtener las frecuencias alélicas y genotípicas de los ejemplares estudiados.
2. Hacer cálculos de estadística genética descriptiva, matemáticas forense y de paternidad a los ejemplares estudiados.
3. Realizar el análisis estadístico para determinar la variabilidad genética que existe entre la población de un criadero comercial y de una población externa.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en colaboración con el laboratorio especializado en Biología Molecular Diagnóstica (www.bimodi.com), dirigido por la Dra. Carla Santana Torres y el Dr. Gino Noris García, ubicado en la Ciudad de Santiago de Querétaro, México.

6.1 Población

El presente estudio se llevó a cabo en una población de 103 perros la mayoría relacionados genéticamente entre ellos de la raza Gran Danés nacidos en México e importados del extranjero (38 ejemplares de la variedad American, 38 de la Criolla y 27 de la Europea) (Anexo 3), en buen estado de nutrición y salud, cumpliendo con los criterios estándar de cartilla de vacunación y certificado médico. De los ejemplares estudiados, 43 (33 Nacionales y 10 Extranjeros: 1 de España, 1 de EUA, 1 Canadá, 1 de Italia, 4 de Alemania, 1 de Suiza, 1 de Hungría) provenían de un criadero comercial especializado (Criadero Herrán Aguirre), mientras que el resto los 60 ejemplares provienen de distintos estados de la republica Mexicana (21 de Guadalajara, 19 del D.F., 3 de Guanajuato, 4 de Veracruz, 5 de Michoacán, 1 Pachuca, 1 de Toluca, 2 del Estado de México, y cuatro extranjeros: 2 EUA y 2 de España) pertenecientes a un club canófilo nacional. Así mismo se utilizó un grupo externo de 6 Cobradores Dorados (Goldens Retrievers) como control, provenientes de dueños particulares del Distrito Federal.

6.2 Criterios de selección

Inclusión.

Perros de la raza Gran Danés, con revisión individual de cada uno de los ejemplares obteniendo información sobre su conformación fenotípica (de acuerdo a los estándares de la AKC y FCI), procedencia, edad adulta (12 meses), sexo (ambos), datos del pedigree así como comentarios proporcionados por el propietario (Cuadro 3) (Anexo 4). Todos los ejemplares fueron identificados mediante la asignación de un número de registro con el que se identificaron las muestras en el laboratorio.

Cuadro 3.

Cuadro representativo del Registro de Identificación de cada uno de los ejemplares

| REGISTRO DE ID DE MUESTRAS DE ADN | |
|-----------------------------------|------------------------|
| # ID: | 005 |
| NOMBRE DEL EJEMPLAR | Tyler (Apolo Guizar) |
| NOMBRE DEL PADRE | Sandokan (Guizar Días) |
| NOMBRE DE LA MADRE | Unika (Diplomatic's) |
| VARIEDAD | Americana |
| COLOR PELAJE | Leonado |
| SEXO | Macho |
| EDAD | 6 años |
| # REGISTRO FCM | FCM V9110-E |
| # MICROCHIP | 126835697 A |
| LUGAR DE PROCEDENCIA | México D.F. |

Exclusión.

Perros que no cumplieron con los criterios de inclusión mencionados en el punto anterior.

Eliminación.

Todos aquellos ejemplares en los que no se pudieron realizar el 100% de los procesos moleculares requeridos para la investigación.

6.3 Obtención de muestras de sangre.

Las muestras de sangre se obtuvieron a partir la vena cefálica derecha (5 mL), utilizando tubos Vacutainer² con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Cada muestra fue etiquetada e identificada, y almacenada a un rango de temperatura entre 2°C y 8°C.

² BD Vacutainer®, ³QIAGENE

6.3.1 Extracción de Material Genético

El material genético (Ácido desoxirribonucleico, ADN) fue extraído a partir de las muestras sanguíneas, empleando un kit de extracción por columnas de afinidad (QIAamp DNA Mini Kit2 por Applied Biosystem) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El procedimiento de purificación de QIAamp DNA2 consta de tres pasos: 1) Lisis celular con Proteinasa K, 2) Adsorción a la membrana QIAamp, eliminación de residuos contaminantes y 3) Elusión de los ácidos nucleicos puros (Figura 1).

6.3.1.1 Lisis con Proteinasa K.

El QIAamp DNA Mini Kit3 contiene proteinasa K, esta enzima es la principal elección para la degradación de proteínas, liberando al ADN, el cual queda en solución.

6.3.1.2 Adsorción a la membrana QIAamp.

Las condiciones del amortiguador de lisis se ajustan para obtener un pH y una concentración de sales óptimas, lo que permite la unión del ADN a la membrana de sílica; el lisado se pasa a la columna de QIAamp, donde el ADN es adsorbido en la membrana de sílica QIAamp durante una breve centrifugación. Las condiciones de pH y de sal en el lisado garantizan que las proteínas y otros contaminantes, que pueden inhibir la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras reacciones enzimáticas, no se retengan en la Membrana QIAamp.

6.3.1.3. Eliminación de residuos contaminantes.

El ADN unido a la membrana QIAamp se lava dos veces por centrifugación con amortiguadores, lo que asegura la completa

remoción de cualquier contaminante residual, sin afectar la unión del ADN.

6.3.1.4 Elusión de los ácidos nucleicos puros.

El ADN purificado es eluido de la columna QIAamp en un amortiguador de TE (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA), el cual tiene condiciones de pH y salinidad que provocan la separación del ADN de la sílica, quedando el ADN en solución.

6.4 Cuantificación de Material genético

El ADN purificado se cuantificó mediante fluorometría, utilizando el kit QuantiT dsDNA BR Assay Kit® y el equipo Qubit de Invitrogen®. El Quant-iT4 dsDNA utiliza un ácido nucleico fluorescente para la cuantificación de pequeñas cantidades de ADN con un consumo mínimo de la muestra.

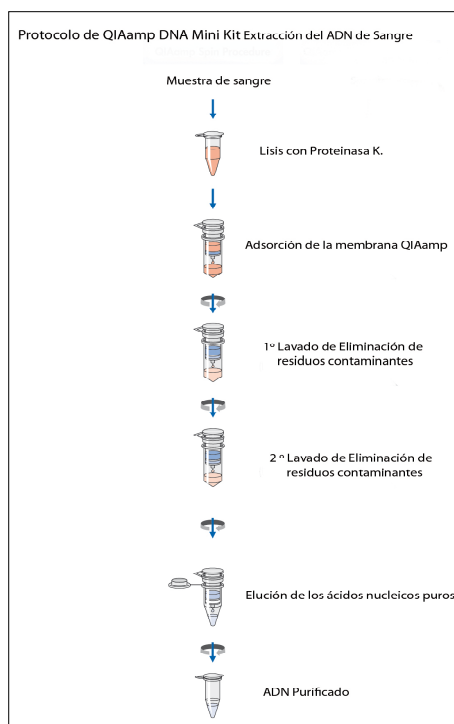


Figura 1. Protocolo para extracción de ADN por el método del *QIAamp DNA Mini Kit*². Ilustración tomada el manual original del mini Kit.

⁴ TM, ⁵®

6.4.1 Protocolo Quant-iT³

Para la optimización de resultados, el fluorocromo y la solución amortiguadora se deben almacenar a temperatura ambiente; mientras que el ADN, el ácido ribonucleico (ARN) y las proteínas deben de conservarse a 4°C.

Para llevar a cabo la cuantificación se preparan los tubos en los que se llevarán a cabo las disoluciones, de acuerdo a las tablas estandarizadas por el manual (QUIAGEN, 2001). Se colocan las muestras estándar para efectuar la calibración correcta dentro del fluorómetro Qubit4 y se realiza el cálculo de concentración revisando que esté perfectamente calibrado, entonces se llevará a cabo la cuantificación de las muestras problema (ADN de los perros).

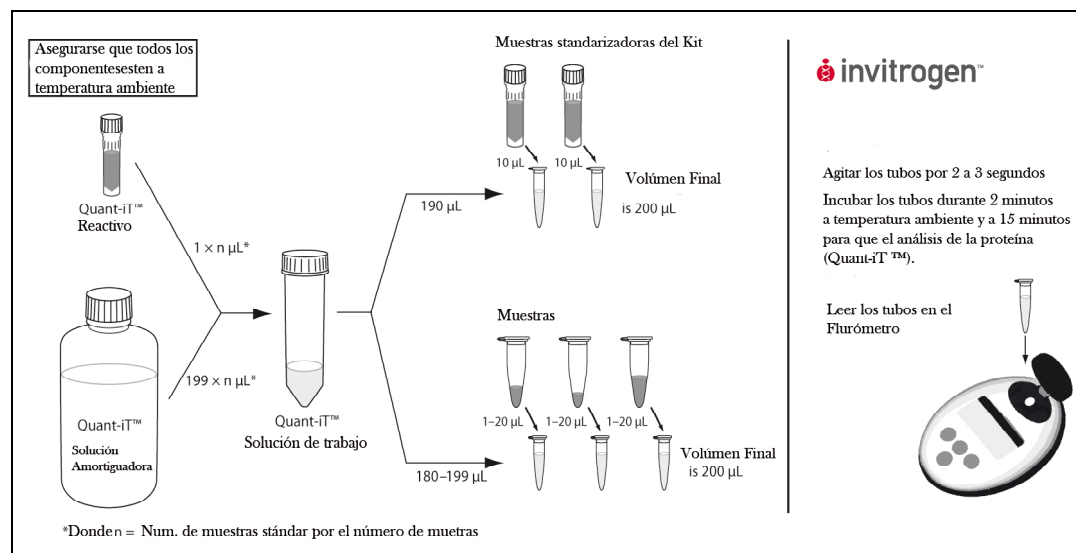


Figura 2. Metodología detallada para la preparación de muestras y calibración del fluorómetro de Qubit®, que permite la cuantificación del material genético. Imagen tomada del manual de fluorometría. (fluorómetro Qubit® de Invitrogen, 2009)

6.5 Genotipificación

6.5.1 Amplificación de los Fragmentos

La obtención de los genotipos de los perros se llevó a cabo con el kit Dog StockMarks® Kit de la compañía Applied Biosystems; el cual analiza los siguientes microsatélites: PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8, FHC2079 (Cuadro 4).

Este *kit* se basa en la amplificación simultánea (PCR múltiplex) de varios locus microsatélite, utilizando cebadores marcados con un flúrocromo (FAM, JOE, NED) y su subsiguiente detección mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI-PRISM 310, que cuenta con los programas *Genescan V 2.1* y *Genotyper V 3.7*. El Cuadro 4 muestra los loci utilizados, el fluorocromo con el que se marcan los diferentes cebadores y el color con el que dicho fluoroforo se observa en la computadora del secuenciador, así como el rango de peso molecular en el cual se detectan los distintos alelos del locus en cuestión.

Cuadro 4.

Loci utilizados en la amplificación de los marcadores caninos del kit de paternidad

| LOCUS | NOMBRE | LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA | UNIDAD DE REPETICIÓN | RANGO DE TAMAÑO (bp) | FLUOROFORO /COLOR |
|----------|-----------------|--------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| PEZ 1 | PEZ01/ CATA1 | 7 | TACA | 95-136 | FAM/AZUL |
| FHC 2054 | FH2054 | 12 | TAGA | 135-183 | FAM/AZUL |
| FHC 2010 | FH2010 | 24 | ATGA | 220-248 | FAM/AZUL |
| PEZ 5 | PEZ05 | 12 | TTTA | 97-121 | JOE / VERDE |
| PEZ 20 | PEZ20 | 22 | AAAT | 152-202 | JOE / VERDE |
| PEZ 12 | PEZ12 | 3 | AAAG | 250-317 | JOE / VERDE |
| PEZ 3 | PEZ03/ D19S8 | 19 | GAA | 95-154 | NED / AMARILLO |
| PEZ 6 | PEZ06/ D27S4 | 27 | AAAT | 166-215 | NED / AMARILLO |
| PEZ 8 | PEZ08/ D17S1 | 17 | AAAT | 230-260 | NED / AMARILLO |
| FHC 2079 | FH2079 | 24 | GGAT | 263-299 | NED / AMARILLO |

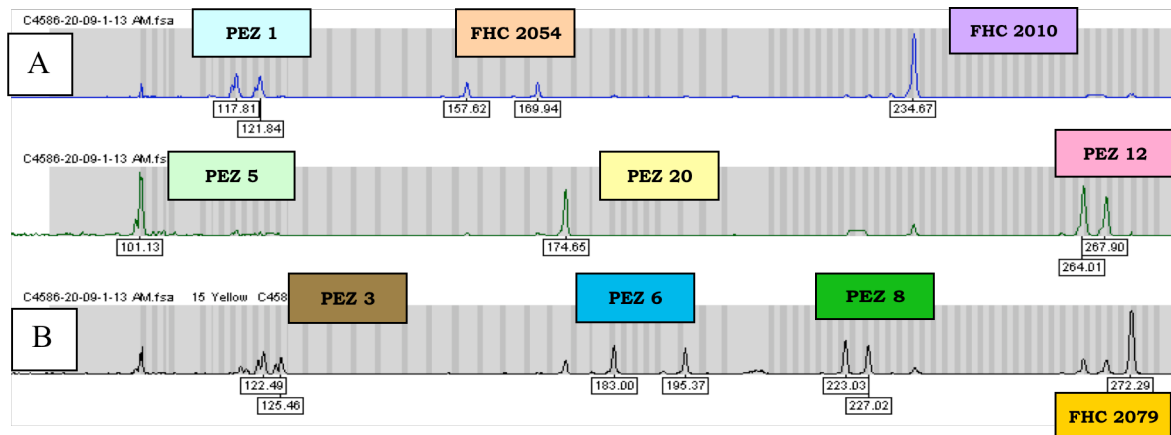


Figura 3. Electroferograma de los productos de la PCR múltiplex, representando los diez genotipos de los microsatélites; en los recuadros se indica el peso molecular calculado por el equipo. (A y B)

En la Figura 3 A y B y el Cuadro 3 se muestran los loci utilizados en la amplificación de los marcadores caninos del kit de paternidad, así como el electroferograma obtenido (*ABI-Prims 310, PE Biosystems*) a partir de un ejemplar estudiado. Cada pico representa un alelo, así el locus PEZ 1, corresponde a un genotipo heterocigoto representado por lo alelos 118 y 122; mientras que locus FHC2010 ejemplifican a un genotipo homocigoto representado por la doble dosis del alelo 235.

6.5.2 Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), se realizó empleando los cebadores fluorescentes descritos en el Cuadro 4, siguiendo las condiciones sugeridas (Cuadro 5 y 6) por el proveedor así como el ciclo de amplificación.

Cuadro 5**Ingredientes utilizados en la reacción de la amplificación de los fragmentos por PCR**

| Componente | Volúmen (µL) para una muestra | Volúmen (µL) para diez muestras |
|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Stock Marks PCR Buffer | 1.4 | 15.3 |
| 25mM de MgCl ₂ | 0.36 | 4.0 |
| dNTP mix | 2.2 | 24.2 |
| AmpliTaq Gold ADN Polimerasa | 0.36 | 4.0 |
| Amplificación del Primer mix | 2.8 | 30.8 |
| Agua Desionizada | 1.9 | 20.8 |
| Volúmen Total | 9.0 | 99.0 |

Cuadro 6**Condiciones de separación para los fragmentos de los Loci en caninos en PCR**

| Tiempos y Temperatura | | | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------|----------------|----------------|--------------------|----------------|----------------|---------------------------|-----------------|
| Ciclo Termal | Paso Inicial | 20 Ciclos cada uno | | | 15 Ciclos cada uno | | | Extensión Final | Mantener |
| | | Fundir | Templar | Extender | Fundir | Templar | Extender | | |
| GeneAmp PCR System 9700 | 1 ciclo 95°C 30 sec | 95°C 30 sec | 58°C 30 sec | 72°C 30 sec | 95°C 30 sec | 58°C 30 sec | 72°C 30 sec | 1 ciclo 72°C 30 min | Mantener 4°C |

6.5.3 Electroforesis Capilar

El Procedimiento de genotipificación se hizo por medio de la electroforesis capilar que se llevó a cabo empleando un analizador genético de ADN (*ABI-Prims 310, PE Biosystems*), empleando un polímero POP-4™ (N° 402838; *PE Biosystems*). El análisis de los fragmentos se realizó empleando el programa *GeneScan V. 2.1*. Las condiciones de separación para los fragmentos analizados se especifican en el cuadro 7. (Magaña J. y Gómez R., 2009)

Cuadro 7

Condiciones de separación para los fragmentos de los Loci. en caninos

| | |
|--------------------------------|------------|
| Tiempo de Inyección | 2 segundos |
| Kilovoltaje de inyección | 15 KV |
| Kilovoltaje durante la corrida | 15 KV |
| Temperatura de la corrida | 60°C |
| Tiempo de corrida | 24 min. |

6.5.4 Análisis estadístico genético

El número de alelos, frecuencias alélicas y genotípicas, heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), índices de diversidad, el desequilibrio genético y la expectativa de Hardy-Weinberg (HWE) con tres pruebas diferentes (Fisher, exacta y mundial, y prueba de correcciones de Bonferroni), se realizaron con el programa de *GENÈTIX V.4.0.5.* (Belkhir K BP, 1996-2004) (Universidad de Montpellier, Montpellier, Francia), el programa *FSTAT V.2.9.3.2.* (Goudet J., 1995) y el *ARLEQUIN V.3.1.* (Excoffier L, 2005).

La prueba exacta de la probabilidad de diferenciación de la Población se llevó a cabo utilizando el programa *ARLEQUIN*, con 100.000 simulaciones. El coeficiente de coancestría (θ o Fis), para estimar la endogamia, se realizó con el programa de análisis datos genéticos (GDA) *V.1.0* (Lewis, PO y Zaykin, D., 2001), mientras que el índice de contenido polimórfico (PIC), probabilidad de concordancia (MP), los poderes de exclusión (PE), de discriminación (PD), y el índice de paternidad típica (TPI) se calcularon por el programa *POWERSTAT V 1.2* (Promega Corporation website: <https://www.promega.es/geneticidtools/powerstats/Default.htm>).

La distancia genética entre las tres variedades se calcularon por el método de la distancia de Nei (Nei, 1978), basada en las diferencias de

frecuencias alélicas entre las variedades. Estos análisis y la construcción del dendrograma *de Neighbor-joining* (NJ) de distancias genéticas se realizó con el programa *POPTREE2* (Takezaki et al., 2009), utilizando un remuestreo tipo *bootstrap* (100.000 repeticiones) para indicar la fiabilidad estadística de las topologías dendrográficas.

Para inferir la estructura de la población de cada una de las variedades del Gran Danés, se realizó un modelo basado en el uso del programa *Structure V.2.3.3* (Pritchard et al., 2010) (Estadística Bayesiana). Este método utiliza las correlaciones genotípicas entre los marcadores independientes para aprender acerca de la estructura de la población en estudio y sobre los antecedentes genéticos de los individuos incluidos en la muestra. El programa crea modelos de los individuos muestreados que pudieron haber heredado los genes de un grupo K "no estructurado" donde en cada una de las poblaciones todos los loci se encuentran en equilibrio con Hardy-Weinberg, sin desequilibrio de ligamiento entre los loci estudiados asegurando que no estén estrechamente vinculados.

Las frecuencias de alelos en cada locus dentro de cada población se supone que son desconocidas. El antecedente genético de cada individuo es representado por un vector, $q = q_1, \dots, q_k$, donde q_k es la proporción del genoma del individuo que se originó en la población K.

El programa utiliza el método de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) para estimar el número de las poblaciones, la frecuencia de alelos en cada población, y el valor de q para cada individuo.

Todas las corridas se realizaron con una longitud de 100.000 en un período, y 700.000 el número de MCMC repite después del período. Este procedimiento calcula $\Pr(X | K)$, estimando la probabilidad de L_n que el observador colocó de genotipos (X) se producirían a lo largo de la gama designada de las posibles K.

Con el fin de reducir el número de variables que pudieran afectar la dimensionalidad del conjunto de datos y buscar una proyección que

permita representar los datos y explicar la variabilidad de los mismos, decidimos realizar un análisis de componentes factoriales (ACF), mediante el programa GENETIX v 4.05 (Belkhir K BP, 1996-2004)

7. RESULTADOS

Frecuencias Alélicas

Los genotipos y las frecuencias alélicas para cada uno de los individuos y de las variedades puede ser obtenidos directamente con el autor por solicitud (Anexo 6)

Para cada variedad de Gran Danés, el número total de alelos de cada locus se encuentran descritos en el cuadro 9, donde también muestra el numero promedio de alelos para cada una de las variedades. Todos los loci fueron polimórficos y el número de alelos detectados por locus varió ampliamente, siendo tan solo 9 en el PEZ 5 y hasta 28 en el PEZ12. Tomando en cuenta todos los loci hubo 141 alelos diferentes

Cuadro 9

Número de Alelos encontrados por Locus en las variedades y poblaciones estudiadas

| Número de Alelos encontrados por Locus en las variedades estudiadas | | | | |
|---|-------------|---------|---------|------------------------------|
| | Poblaciones | | | |
| Locus | Americana | Criolla | Europea | Total de Alelos ^c |
| PEZ1 | 4 | 3 | 5 | 12 |
| FHC2054 | 4 | 4 | 7 | 15 |
| FHC2010 | 4 | 4 | 5 | 13 |
| PEZ5 | 4 | 2 | 3 | 9 |
| PEZ20 | 4 | 4 | 3 | 11 |
| PEZ12 | 11 | 7 | 10 | 28 |
| PEZ3 | 5 | 5 | 7 | 17 |
| PEZ6 | 8 | 4 | 5 | 17 |
| PEZ8 | 5 | 1 | 4 | 10 |
| FHC2079 | 3 | 3 | 3 | 9 |
| Total alelos ^a | 52 | 37 | 52 | 141 |
| Promedio ^b | 5.2 | 3.7 | 5.2 | 26.5 |

^a Total de alelos encontrados en cada variedad

^b Promedio total de alelos en cada variedad

^c Número total de alelos por locus que se encuentran en todas las poblaciones

Las frecuencias de distribución alélicas, así como los parámetros de estadística descriptiva poblacional para cada uno de los loci estudiados se encuentran resumidos en la Cuadro 8 complementado por el cuadro 10. Como podemos observar, la mayor diversidad genética (DG), esta representada por el locus PEZ12, el cual mostró la mayor variación alélica (k), representada por 11, 7 y 10 alelos diferentes, en las poblaciones, americana, criolla y europea, respectivamente. Por su parte, los marcadores menos polimórficos estuvieron representados por PEZ5 y FHC2079.

A manera de resumen, la Figura 4 muestra la frecuencia de distribución alélica correspondiente a los alelos más frecuentes encontrados en las tres variantes. Interesantemente todos los loci en todas las variedades presentaron importantes diferencias significativas ($P < 0.05$), siendo los loci PEZ6 (5 alelos de 8 alelos totales) y PEZ12 (5 alelos de 11 alelos totales) los que mostraron mayores diferencias en la frecuencia de los alelos entre las tres variantes, mientras que el locus FHC210 fue el que mostró menores diferencias (2 alelos de 3 alelos totales) (ver Cuadro 8).

Con el fin de determinar las diferencias genéticas entre la variedad Criolla y las variedades Americana y los 10 loci; se realizó un análisis de diferenciación genética empleando el programa ARLEQUIN V 3.1 (Excoffier L, 2005). Los resultados se muestran en el cuadro 11.

Como podemos observar, entre la variedad Criolla y la variedad Americana 6 (PEZ5, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8 y FHC2079) de los 10 loci mostraron importantes diferencias significativas ($P < 0.002$), mientras que la diferencia total, considerando los 10 loci, fue de $P = 0.05965 \pm 0.0011$. Por su parte, al comparar la variedad Criolla *vs* Europea, encontramos que 4 (PEZ5, PEZ3, PEZ6 y PEZ8) de los 10 loci mostraron una diferencia significativa muy importante ($P < 0.0002$), lo que dio origen a que empleando los 10 loci la diferencia total también fuera significativa ($P = 0.00003 \pm 0.0000$). En el cuadro 9

se encuentran el número de alelos por locus en cada una de las variedades y poblaciones estudiadas.

Cuadro 11

Comparación entre los alelos más frecuentes en las tres variedades de la raza Gran Danés.

| locus | alelos | frecuencia | | | Diferencias significativas | | |
|---------|--------|------------|------|------|----------------------------|------------|------------|
| | | Ame | Crio | Euro | CRI VS AME | CRE VS EUR | EUR VS AME |
| Pez1 | 106 | 13% | 8% | 2% | P >0.05 | P >0.05 | 0.0158602 |
| | 114 | 13% | 2% | 38% | 0.049677 | 0.0000069 | 0.0026406 |
| | 118 | 65% | 90% | 42% | 0.0035683 | 0.0000003 | 0.0194026 |
| | 122 | 10% | 0% | 5% | 0.0216372 | P >0.05 | P >0.05 |
| FHC2054 | 157 | 31% | 50% | 32% | P >0.05 | 0.0498928 | P >0.05 |
| | 161 | 31% | 13% | 6% | 0.0262855 | P >0.05 | 0.0003665 |
| | 165 | 0% | 0% | 11% | P >0.05 | 0.0198623 | 0.0198623 |
| | 173 | 0% | 0% | 14% | P >0.05 | 0.0076805 | 0.0076805 |
| FHC2010 | 227 | 19% | 4% | 18% | 0.0248973 | 0.0243845 | P >0.05 |
| | 235 | 31% | 56% | 36% | 0.0135547 | 0.0349998 | P >0.05 |
| PEZ5 | 101 | 90% | 69% | 48% | 0.0023199 | 0.0309322 | 0.0000050 |
| | 105 | 4% | 0% | 48% | P >0.05 | 0.0000000 | 0.0000003 |
| | 109 | 4% | 31% | 3% | 0.0005095 | 0.0000296 | P >0.05 |
| PEZ20 | 173 | 42% | 71% | 86% | 0.0039726 | 0.0413456 | 0.0000005 |
| | 179 | 35% | 23% | 9% | P >0.05 | 0.0407480 | 0.0005439 |
| | 183 | 19% | 4% | 0% | 0.0248873 | P >0.05 | 0.0002469 |
| PEZ12 | 263 | 33% | 13% | 27% | 0.0151684 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 275 | 17% | 2% | 3% | 0.0142439 | P >0.05 | 0.0110495 |
| | 285 | 6% | 0% | 0% | P >0.05 | P >0.05 | 0.0395640 |
| | 301 | 10% | 60% | 38% | 0.0000003 | 0.0173362 | 0.0000327 |
| | 305 | 2% | 8% | 0% | P >0.05 | 0.0169649 | P >0.05 |
| PEZ3 | 118 | 23% | 0% | 33% | 0.0004240 | 0.0000085 | P >0.05 |
| | 122 | 52% | 38% | 8% | P >0.05 | 0.0000847 | 0.0000001 |
| | 128 | 0% | 0% | 14% | P >0.05 | 0.0076805 | 0.0076805 |
| | 134 | 2% | 23% | 2% | 0.0020282 | 0.0002367 | P >0.05 |
| | 138 | 2% | 0% | 9% | P >0.05 | 0.0318591 | P >0.05 |
| PEZ6 | 171 | 21% | 0% | 0% | 0.0008345 | P >0.05 | 0.0001035 |
| | 179 | 15% | 44% | 5% | 0.0016687 | 0.0000004 | P >0.05 |
| | 183 | 8% | 19% | 38% | P >0.05 | 0.0275113 | 0.0003486 |
| | 191 | 2% | 0% | 0% | P >0.05 | 0.0020403 | P >0.05 |
| | 199 | 33% | 23% | 52% | 0.0216372 | P >0.05 | 0.0356005 |
| PEZ8 | 219 | 13% | 0% | 2% | 0.0114120 | P >0.05 | 0.0158602 |
| | 223 | 19% | 0% | 38% | 0.0016252 | 0.0000014 | 0.0275113 |
| | 227 | 58% | 100% | 38% | 0.0000005 | 0.0000000 | 0.0306273 |
| | 231 | 8% | 0% | 2% | 0.0410509 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 243 | 2% | 0% | 12% | P >0.05 | 0.0123683 | 0.0497246 |
| FHC2079 | 268 | 54% | 27% | 35% | 0.0069022 | P >0.05 | 0.0396761 |
| | 276 | 2% | 19% | 6% | 0.0075207 | 0.0353329 | P >0.05 |

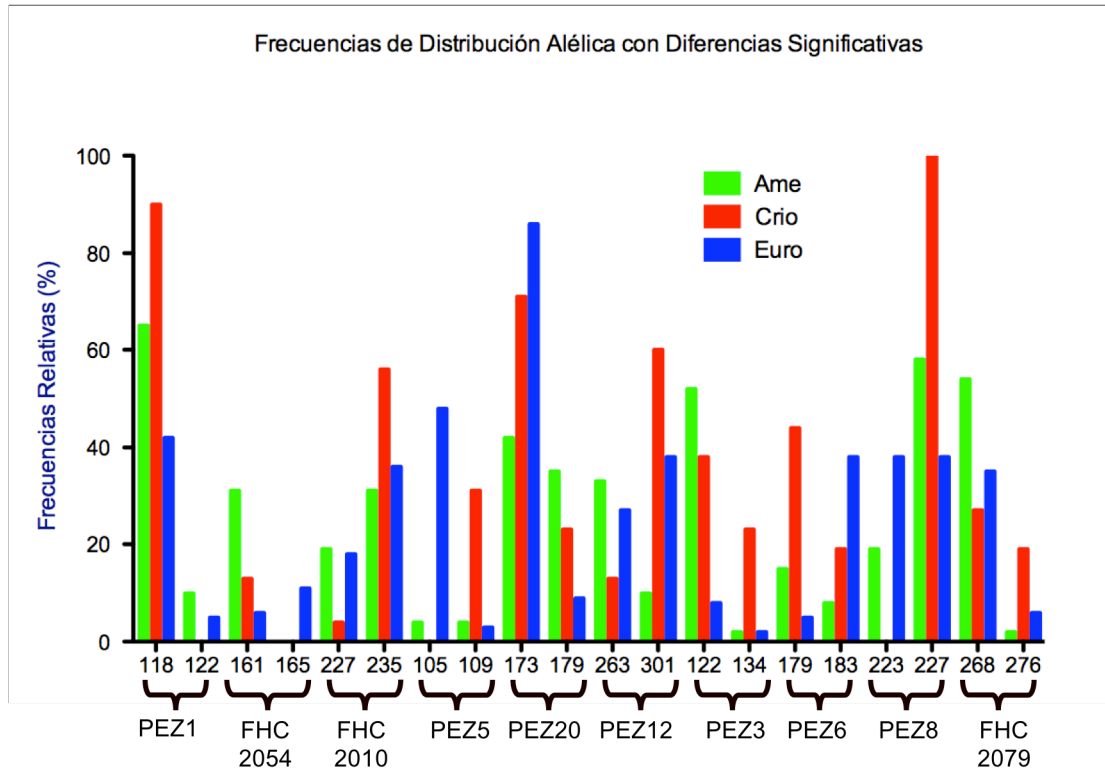


Figura 4. Frecuencias de distribución Alélica que presentaron diferencias significativas en las tres variedades de la raza Gran Danés

En relación a la determinación del equilibrio con respecto a la ecuación matemática de Hardy-Weinberg (HW), se emplearon tres métodos distintos (*Likelihood ratio test*, *Exact* y *Global*), los cuales arrojaron datos similares indicando que en las tres variantes poblacionales, todos los loci se encuentran en equilibrio ($p > 0.05$). De la misma forma, realizamos la corrección de Bonferroni con el fin de evitar algún error estadístico, y encontrar verdaderos niveles de significancia; para este caso particular la $p = 0.00167$, y debido a que ningún loci de ninguna variante es menor a este valor, podemos constatar que efectivamente todos los loci están en equilibrio con HW.

Cuadro 8

Frecuencias alélicas, estadística descriptiva, forense y de paternidad de los 10 loci estudiados en las tres variedades de Gran Danés

| | PEZ1 | | | FHC2054 | | | FHC2010 | | | PEZ5 | | | PEZ20 | | | PEZ12 | | | PEZ3 | | | PEZ6 | | | PEZ8 | | | FHC2079 | | |
|----------------------------|---------|---------|--------|---------|--------|--------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|--------|------|---------|---------|---------|--------|
| | AMER | CRIO | EURO | AMER | CRIO | EURO | AMER | CRIO | EURO | AMER | CRIO | EURO | AMER | CRIO | EURO | AMER | CRIO | EURO | AMER | CRIO | EURO | AMER | CRIO | EURO | AMER | CRIO | EURO | AMER | CRIO | EURO |
| k | 4 | 3 | 5 | 4 | 4 | 7 | 4 | 4 | 5 | 4 | 2 | 3 | 4 | 4 | 3 | 11 | 7 | 10 | 5 | 5 | 7 | 8 | 4 | 5 | 5 | 1 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| GD | 0.551 | 0.194 | 0.666 | 0.708 | 0.638 | 0.783 | 0.649 | 0.551 | 0.721 | 0.197 | 0.438 | 0.537 | 0.68 | 0.452 | 0.247 | 0.843 | 0.606 | 0.771 | 0.646 | 0.720 | 0.756 | 0.816 | 0.714 | 0.597 | 0.616 | 0 | 0.7 | 0.525 | 0.611 | 0.535 |
| Ho | 0.6250 | 0.2083 | 0.6364 | 0.6250 | 0.5 | 0.7576 | 0.75 | 0.6250 | 0.5455 | 0.2083 | 0.4583 | 0.5455 | 0.5833 | 0.5 | 0.2727 | 0.75 | 0.7083 | 0.8182 | 0.6250 | 0.7083 | 0.7879 | 0.7917 | 0.75 | 0.5455 | 0.5417 | 0 | 0.8788 | 0.5417 | 0.6250 | 0.4545 |
| He | 0.5408 | 0.1901 | 0.6556 | 0.6918 | 0.6215 | 0.7704 | 0.6372 | 0.5408 | 0.7075 | 0.1936 | 0.4297 | 0.5289 | 0.6641 | 0.4436 | 0.2438 | 0.8238 | 0.5955 | 0.7599 | 0.6319 | 0.7049 | 0.7447 | 0.7986 | 0.6997 | 0.5868 | 0.6066 | 0 | 0.6919 | 0.5148 | 0.5981 | 0.5257 |
| HW[*](P) | 0.6495 | 0.8902 | 0.6902 | 0.2303 | 0.0963 | 0.6044 | 0.6822 | 0.9266 | 0.0113 | 0.9982 | 0.6061 | 0.4316 | 0.2643 | 0.9198 | 0.6684 | 0.9944 | 0.9447 | 0.9164 | 0.9202 | 0.2684 | 0.8305 | 0.3579 | 0.7403 | 0.9439 | 0.2388 | - | 0.6381 | 0.6423 | 0.9709 | 0.1638 |
| HW^{**}(P) | 0.9065 | 1 | 0.4793 | 0.2343 | 0.1137 | 0.6065 | 0.8740 | 0.5465 | 0.0084 | 1 | 1 | 0.5715 | 0.2421 | 1 | 1 | 0.6496 | 0.8353 | 0.2800 | 0.8875 | 0.4275 | 0.6315 | 0.1043 | 0.7018 | 0.9615 | 0.1115 | - | 0.1225 | 0.6696 | 0.9378 | 0.2040 |
| HW^{***}(P) | 0.9216 | 1 | 0.4173 | 0.2497 | 0.1087 | 0.4311 | 0.9135 | 0.8438 | 0.0207 | 1 | 0.7601 | 0.6201 | 0.2063 | 0.8261 | 1 | 0.1441 | 0.9801 | 0.8305 | 0.4848 | 0.5194 | 0.7437 | 0.4556 | 0.7425 | 0.3267 | 0.2297 | - | 0.9971 | 0.6314 | 0.6486 | 0.2044 |
| G | 10 | 6 | 15 | 10 | 10 | 28 | 10 | 10 | 15 | 10 | 3 | 6 | 10 | 10 | 6 | 66 | 28 | 55 | 15 | 15 | 28 | 36 | 10 | 15 | 15 | 1 | 10 | 6 | 6 | 6 |
| T | 24 | 24 | 33 | 24 | 24 | 33 | 24 | 24 | 33 | 24 | 24 | 33 | 24 | 24 | 33 | 24 | 24 | 33 | 24 | 24 | 33 | 24 | 24 | 33 | 24 | 24 | 33 | 24 | 24 | 33 |
| T' | 48 | 48 | 66 | 48 | 48 | 66 | 48 | 48 | 66 | 48 | 48 | 66 | 48 | 48 | 66 | 48 | 48 | 66 | 48 | 48 | 66 | 48 | 48 | 66 | 48 | 48 | 66 | 48 | 48 | 66 |
| MATEMÁTICA FORENSE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MP | 0.247 | 0.656 | 0.188 | 0.17 | 0.205 | 0.096 | 0.226 | 0.347 | 0.157 | 0.642 | 0.427 | 0.343 | 0.181 | 0.361 | 0.57 | 0.063 | 0.591 | 0.118 | 0.194 | 0.163 | 0.128 | 0.108 | 0.160 | 0.229 | 0.226 | 1 | 0.232 | 0.365 | 0.243 | 0.291 |
| MP (1 in) | 4 | 1 | 5 | 6 | 5 | 10 | 4 | 3 | 6 | 1 | 2 | 3 | 5 | 3 | 2 | 16 | 5 | 8 | 5 | 6 | 8 | 9 | 6 | 4 | 4 | - | 4 | 3 | 4 | 3 |
| PD | 0.753 | 0.344 | 0.812 | 0.83 | 0.795 | 0.904 | 0.774 | 0.653 | 0.843 | 0.358 | 0.573 | 0.657 | 0.819 | 0.639 | 0.43 | 0.938 | 0.809 | 0.882 | 0.806 | 0.837 | 0.872 | 0.892 | 0.84 | 0.771 | 0.774 | - | 0.768 | 0.635 | 0.757 | 0.709 |
| PIC | 0.5 | 0.18 | 0.59 | 0.63 | 0.55 | 0.74 | 0.57 | 0.45 | 0.66 | 0.19 | 0.34 | 0.42 | 0.6 | 0.39 | 0.23 | 0.81 | 0.57 | 0.73 | 0.57 | 0.65 | 0.7 | 0.77 | 0.65 | 0.51 | 0.56 | - | 0.64 | 0.4 | 0.53 | 0.44 |
| θ | -0.1348 | -0.0747 | 0.0447 | 0.1176 | 0.2159 | 0.0320 | -0.1564 | -0.1348 | 0.2435 | -0.0550 | -0.0454 | -0.0158 | 0.1424 | -0.1062 | -0.1034 | 0.1106 | -0.1689 | -0.0614 | 0.0322 | 0.0163 | -0.0426 | 0.0299 | -0.0507 | 0.0857 | 0.1205 | - | -0.2557 | 0.031 | -0.0237 | .1504 |
| PATERNITY | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PE | 0.322 | 0.032 | 0.337 | 0.322 | 0.188 | 0.523 | 0.510 | 0.322 | 0.230 | 0.032 | 0.154 | 0.23 | 0.271 | 0.188 | 0.053 | 0.51 | 0.441 | 0.633 | 0.322 | 0.441 | 0.577 | 0.584 | 0.51 | 0.23 | 0.227 | - | 0.752 | 0.227 | 0.322 | 0.151 |
| TPI | 1.33 | 0.63 | 1.38 | 1.33 | 1 | 2.06 | 2 | 1.33 | 1.1 | 0.63 | 0.92 | 1.1 | 1.2 | 1 | 0.69 | 2 | 1.71 | 2.75 | 1.33 | 1.71 | 2.36 | 2.4 | 2 | 1.1 | 1.09 | 0.5 | 4.13 | 1.09 | 1.33 | 0.92 |

k=alelos; GD=Diversidad Genética; Ho= Homocigotos Observados; He= Heterocigotos Observados; HW^{*}= test de Hardy-Weinberg (Likelihood) valor de P; HW^{**}= test de Hardy-Weinberg (Exact test) valor de P; HW^{***}= Hardy-Weinberg test (Global test) P value; G=diferent genotypes; T=Total (Nº individuals); T'=Total (alleles)
 PC= Poder de Coincidencia; PD=Poder de discriminación ; PIC=Índice de Contenido Polimórfico ; θ=Coficiente de Endogamia;
 PE=Poder de Exclusión ; TPI=Índice Típico de Paternidad

Cuadro 10

Heterocigotos Observados Ho, Heterocigotos Esperados Hs, Fis y valores de los Heterocigotos de cada locus en cada una de las variedades y poblaciones estudiadas

| Heterocigotos Observados Ho, Heterocigotos Esperados Hs, Fis y valores de los Heterocigotos de cada locus en cada una de las variedades y poblaciones estudiadas | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------|--------|---------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| | Heterocigotos por Locus | | | | | | | | | | | | |
| Población | Hs | Ho | Fis | PEZ1 | FHC2054 | FHC2010 | PEZ5 | PEZ20 | PEZ12 | PEZ3 | PEZ6 | PEZ8 | FHC2079 |
| Americana | 0.6398 | 0.6105 | 0.0305 | 0.5408 | 0.6918 | 0.6372 | 0.1936 | 0.6641 | 0.8238 | 0.6319 | 0.7986 | 0.6066 | 0.5148 |
| Criolla | 0.5843 | 0.5579 | -0.0325 | 0.1901 | 0.6215 | 0.5408 | 0.4297 | 0.4436 | 0.5955 | 0.7049 | 0.6997 | 0 | 0.5981 |
| Europea | 0.6210 | 0.5815 | 0.0110 | 0.6556 | 0.7704 | 0.7075 | 0.5289 | 0.2438 | 0.7599 | 0.7447 | 0.5868 | 0.6919 | 0.5257 |
| Criadero | 0.5937 | 0.5349 | 0.1107 | 0.4543 | 0.6579 | 0.6368 | 0.5649 | 0.3651 | 0.7372 | 0.7723 | 0.7244 | 0.4210 | 0.6033 |
| Externa | 0.6432 | 0.6183 | 0.0471 | 0.6053 | 0.7656 | 0.6674 | 0.4099 | 0.5211 | 0.6977 | 0.7603 | 0.6500 | 0.6064 | 0.5004 |

Estadística Forense y de Paternidad

Con el fin de validar la capacidad de los marcadores empleados para distinguir genéticamente a las tres variantes de la raza (Americana, Criolla y Europea), así como a los individuos que las integran; realizamos los cálculos de estadística forense así como de paternidad (Cuadro 7). La estadística forense se representó por la probabilidad de coincidencia (PC), la cual nos permitió determinar qué tan poderoso fue el panel de marcadores empleados para poder excluir un genotipo en particular; y por el poder de discriminación (PD) que se refiere a una evaluación de la capacidad de nuestros loci para individualizar genéticamente a un organismo. A este respecto, logramos determinar que los loci PEZ12 y PEZ6, corresponden a los marcadores con mayor índice de contenido polimórfico (PIC), el cual, para el PEZ12 resultó ser de 0.70 (valor promedio); mientras que para el PEZ6, el valor promedio resultó ser de 0.64; razón por la cual son los marcadores con mayor PD. De la misma forma, la estadística de paternidad indica que nuevamente éstos loci (PEZ12 y PEZ6) son los más efectivos para excluir individuos (Cuadro 8) mostrando un poder de exclusión (PE) promedio de 0.528 para el PEZ12 y de 0.441 para el PEZ6.

En el Cuadro 12, se presentan los PD, PE y el índice de paternidad típica (IPT), para los 10 loci empleados, en cada variante poblacional. Como podemos observar, el PD es muy cercano a uno, mientras que la PC promedio tiene la capacidad de distinguir a un individuo de cerca de 5 millones; siendo la variante Americana la que mayor PC presentó (1 individuo en ≈ 8 millones), mientras que en las variantes Europea y Criolla la PC fue de 1 en 7 millones y de 1 en 37 mil individuos, respectivamente.

Cuadro 12

Resumen de los índices de estadística forense y de paternidad para los diez 10 loci en las tres variedades de la raza Gran Danés tres variedades de Gran Danés.

| | <i>Matemática Forense</i> | | | <i>Paternidad</i> | |
|--|---------------------------|-----------------------------|-------------|-------------------|----|
| <i>VARIEDADES PC COMBINADO PC (1 IN) PD para los 10 loci</i> | Θ | <i>ITP para los 10 loci</i> | | | |
| <i>AMERICANA</i> | 1.2E-07 | 8328461 | 0.99999988 | 0.0305 | 20 |
| <i>CRIOLLA</i> | 2.7E-05 | 37117 | 0.999973058 | -0.0325 | 3 |
| <i>EUROPEA</i> | 1.3E-07 | 7730256 | 0.999999871 | 0.0110 | 64 |

PC= Poder de Coincidencia; PD=Poder de discriminación; Θ =Coeficiente de endogamia; TPI=Índice Típico de paternidad

Frecuencias Genotípicas

La Figura 5 muestra las frecuencias genotípicas que presentaron una diferencia estadística significativa, por locus, entre las variantes estudiadas. Por lo que respecta al locus PEZ1, el genotipo (118,118) resultó ser el más frecuente en las tres variedades, presentándose en el 38% de la variante Americana, en el 15% de la Europea y en el 79% de la Criolla. Por su parte, los genotipos (106,118), (110,118) y (114,114) presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las variantes Americana vs Europea y Europea vs Criolla; mientras que el genotipo (118,118) presentó una diferencia entre la variantes Criolla y las variantes Americana y Europea. Finalmente el genotipo (114,118) mostró diferencia entre las variantes Europea vs Criolla (Cuadro 13).

Para el caso del locus FHC205, el genotipo más frecuente en las tres variedades fue (157,157), el que se presentó en una frecuencia del 13%, 12% y 25% en las variedades Americana, Europea y Criolla, respectivamente. Por su parte, el genotipo (153,161) resultó ser el más frecuente (25%) en la variedad Americana; mientras que los genotipos (153,157) y (157,157) se presentaron en el 25% de la variante Criolla. Finalmente el genotipo (153,161) fue el único que presentó una

diferencia significativa entre las variedades Americana *vs* Europea ($P=0.0125917$) y Americana *vs* Criolla ($P=0.0088288$).

Por lo que se refiere al locus FHC210, el genotipo más frecuente en las tres variedades fue (223,235), mientras que los genotipos (223,227), (223,223) y (227,235) resultaron ser los más frecuentes en las variantes Americana (25%), Europea (33%) y Criolla (29%), respectivamente. Al comparar las frecuencias entre las variantes, el genotipo (223,227) presentó diferencias significativas entre la variante Americana *vs* las variantes Europea ($P=0.0023931$) y Criolla ($P=0.0408751$).

Por su parte, para el locus PEZ5 encontramos que el genotipo más frecuente de las tres variedades fue (101,101), el cual mostró una frecuencia del 79% para la variedad Americana y del 21% y 46% para las variantes Europea y Criolla, respectivamente. Asimismo, la variante Europea estuvo principalmente representada por el genotipo (101,105) el que se presentó en el 48% de la población; mientras que para la variante Criolla, presentó las mayores frecuencias del genotipo (101,109), el que representó al 46% de la variante. Al comparar las frecuencias entre variantes encontramos que, el genotipo (101,101) presentó diferencias significativas entre las tres variedades. Así la variedad Americana mostró importantes diferencias con la variedad Europea ($P=0.0000144$) y Criolla ($P=0.0170727$); mientras que al comparar a las variedades Europea *vs* Criolla encontramos una sutil diferencia de $P=0.0483333$. Por lo que se refiere a los genotipos (101,105) y (105,105), éstos presentaron diferencias significativas entre las variedades Americana *vs* Europea ($P=0.0012827$ y 0.0092802 , respectivamente) y Europea *vs* Criolla ($P=0.0000577$ y $P=0.0092802$, respectivamente). Finalmente, el genotipo (101,109) mostró diferencia entre la variedad Criolla *vs* las variedades Americana ($P=0.0034646$) y Europea ($P=0.0004103$).

Con respecto al locus PEZ20, el genotipo (175,175) resultó ser el más frecuente en todas las variedades, presentándose en el 25% de la variedad Americana, en el 46% de la variedad Criolla y en la totalidad (100%) de la variedad Europea. De forma independiente, el genotipo (179,183) representó al 21% de la variedad Americana; mientras que el 38% de la variedad Criolla presentó el genotipo (175,179). Al comparar las diferencias entre variedades, encontramos que los genotipos (175,183) y (179,179), presentaron una diferencia significativa al comparar la variedad Americana *vs* la variedad Europea ($P=0.0150117$, en ambos casos). Mientras que el genotipo (175,175) mostró importantes diferencias al comparar la variedad Europeas contra las variedades Americana ($P=0.000000$) y Criolla ($P=0.0000015$). Por su parte, el genotipo (179,183) presentó diferencias entre la variedad Americana *vs* las variedades Europea ($P=0.0060476$) y Criolla ($P=0.0181523$).

Para el locus PEZ12, las diferencias principales se encontraron en el genotipo (287,301), el que mostró diferencias entre la variedad Americana *vs* Criolla ($P=0.0181523$); y los genotipos (301,301) y (301,305) que mostraron diferencias entre las variedades Americana *vs* Criolla con valores de significancia estadística de $P=0.0042003$ y $P=0.0150117$, respectivamente.

En el caso del locus PEZ3, las principales diferencias entre variantes se encontraron en los genotipos (118,122) y (122,122), que se presentaron principalmente en la variedad Americana (Cuadro 12). Mientras que al comparar las variedades Americana *vs* Criolla, encontramos que los genotipos (118,122), (122,134) y (124,138) mostraron importantes diferencias ($P=0.0181523$, $P=0.0181523$ y $P=0.0367139$, respectivamente). Por último al comparar las variedades Europea *vs* Criolla, los genotipos con diferencia significativa fueron: (118,126) con una $P=0.0053041$, (112,122) con una $P=0.0369185$ y (122,134) con una $P=0.0060476$.

En lo referente al locus PEZ6, los genotipos (183,183), (183,191), (191,191) y (191,199) mostraron diferencias significativas entre la variedad Americana *vs* Europea ($P < 0.03$); mientras que al comparar las variedad Criolla con las variedades Americana y Europea, encontramos que el genotipo (179,199) muestra diferencias en el primer caso ($P = 0.0181523$), mientras que para el segundo caso los genotipos (179,179) y (191,191) presentaron una $P < 0.006$.

Para el caso de los loci PEZ8 y FHC2079, el genotipo (227,227) del locus PEZ8, se presentó en el 100% de la variedad Criolla por lo que mostró importantes diferencias al compararse con la variedad Americana ($P = 0.000001$) y con la Europea ($P = 0.000000$); mientras que para el caso del locus FHC2079 las diferencias se encontraron en genotipo (268,268) entre las variedades Americana *vs* Criolla ($P = 0.0201368$).

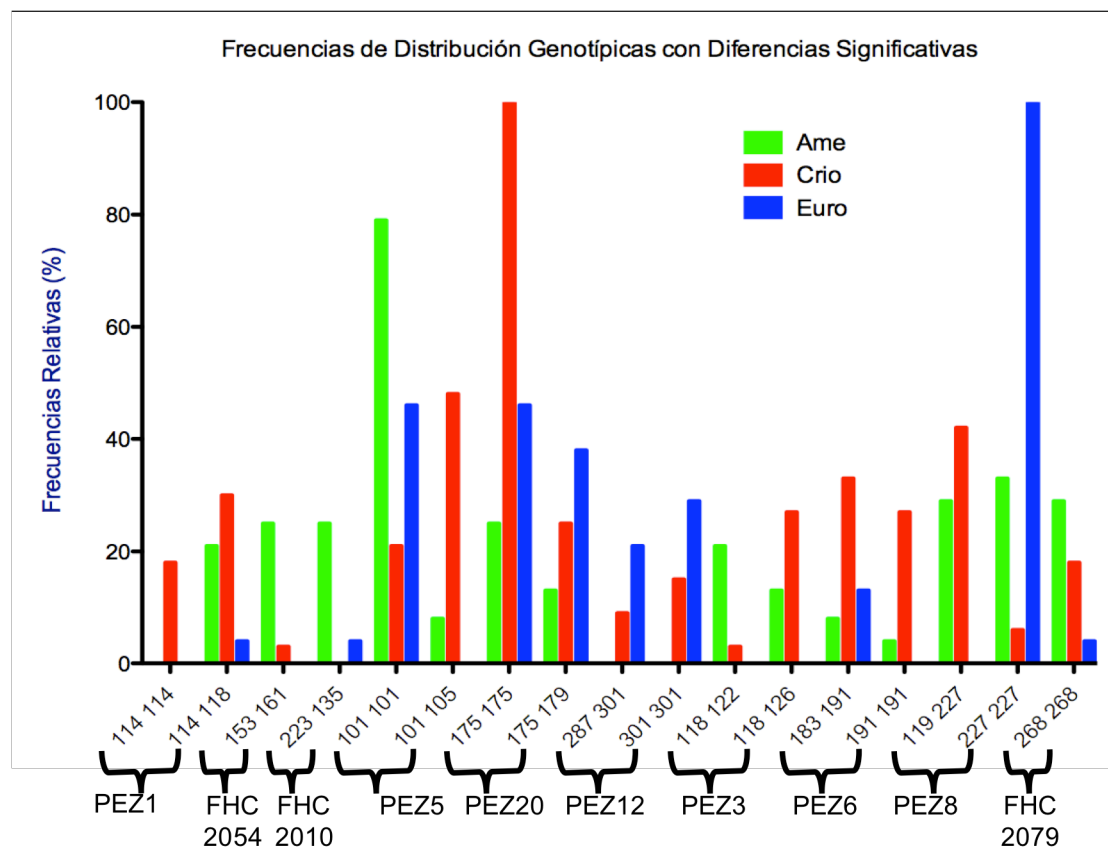


Figura 5. Frecuencias de distribución Genotípica que presentaron diferencias significativas en los loci de las tres variedades de la raza Gran Danés

Cuadro 13

Comparación de las frecuencias genotípicas entre las tres variedades de la raza Gran Danés

| locus | Genotipos | frecuencia | | | Diferencias significativas | | |
|---------|-----------|------------|------|------|----------------------------|------------|------------|
| | | Ame | Crio | Euro | CRI VS AME | CRI VS EUR | EUR VS AME |
| Pez1 | 106, 118 | 21% | 0% | 17% | 0.0060476 | P >0.05 | 0.0150117 |
| | 110, 118 | 0% | 18% | 0% | 0.0272168 | 0.0272168 | P >0.05 |
| | 114, 114 | 0% | 18% | 0% | 0.0272168 | 0.0272168 | P >0.05 |
| | 114, 118 | 21% | 30% | 4% | P >0.05 | P >0.05 | 0.0135601 |
| | 118, 118 | 38% | 15% | 79% | P >0.05 | 0.0034148 | 0.0000013 |
| FHC2054 | 153, 153 | 17% | 9% | 21% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 153, 157 | 80% | 18% | 25% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 153, 161 | 25% | 3% | 0% | 0.0125917 | 0.0088288 | P >0.05 |
| | 153, 173 | 0% | 12% | 0% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 157, 157 | 13% | 12% | 25% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 157, 161 | 21% | 6% | 17% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| FHC2010 | 223, 223 | 17% | 33% | 8% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 223, 135 | 25% | 0% | 4% | 0.0023931 | 0.0408751 | P >0.05 |
| | 223, 235 | 33% | 29% | 50% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 231, 235 | 13% | 17% | 4% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 135, 235 | 8% | 21% | 29% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| PEZ5 | 101, 101 | 79% | 21% | 46% | 0.0000144 | 0.0170727 | 0.0483333 |
| | 101, 105 | 8% | 48% | 0% | 0.0012827 | P >0.05 | 0.0000577 |
| | 101, 109 | 8% | 6% | 46% | P >0.05 | 0.0034646 | 0.0004103 |
| | 105, 105 | 0% | 24% | 0% | 0.0092802 | P >0.05 | 0.0092802 |
| PEZ20 | 175, 175 | 25% | 100% | 46% | 0.000000 | P >0.05 | 0.0000015 |
| | 175, 179 | 13% | 25% | 38% | P >0.05 | 0.0455003 | P >0.05 |
| | 175, 183 | 17% | 0% | 8% | 0.0150117 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 179, 179 | 17% | 0% | 4% | 0.0150117 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 179, 183 | 21% | 0% | 0% | 0.0060476 | 0.0181523 | P >0.05 |
| PEZ12 | 263, 263 | 13% | 0% | 0% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 263, 305 | 8% | 24% | 17% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 287, 301 | 0% | 9% | 21% | P >0.05 | 0.0181523 | P >0.05 |
| | 301, 301 | 0% | 15% | 29% | 0.0458795 | 0.0042003 | P >0.05 |
| | 301, 305 | 0% | 0% | 17% | P >0.05 | 0.0150117 | P >0.05 |
| PEZ3 | 118, 122 | 21% | 3% | 0% | 0.0305884 | 0.0181523 | P >0.05 |
| | 118, 126 | 13% | 27% | 0% | P >0.05 | P >0.05 | 0.0053041 |
| | 122, 122 | 29% | 0% | 13% | 0.0009247 | P >0.05 | 0.0369185 |
| | 122, 126 | 21% | 6% | 25% | P >0.05 | P >0.05 | 0.0421066 |
| | 122, 134 | 0% | 0% | 21% | P >0.05 | 0.0181523 | 0.0060476 |
| | 124, 138 | 0% | 3% | 17% | P >0.05 | 0.0367139 | P >0.05 |
| PEZ6 | 171, 171 | 13% | 0% | 0% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 179, 179 | 4% | 0% | 21% | P >0.05 | P >0.05 | 0.0060476 |
| | 179, 187 | 4% | 0% | 13% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 179, 191 | 13% | 6% | 25% | P >0.05 | P >0.05 | 0.0421066 |
| | 183, 183 | 0% | 18% | 4% | 0.0272168 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 183, 191 | 8% | 33% | 13% | 0.0263532 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 191, 191 | 4% | 27% | 0% | 0.0235419 | P >0.05 | 0.0053041 |
| | 191, 199 | 21% | 3% | 0% | 0.0305884 | 0.0181523 | P >0.05 |
| PEZ8 | 119, 227 | 29% | 42% | 0% | P >0.05 | 0.0042003 | 0.0002390 |
| | 223, 243 | 0% | 15% | 0% | 0.0458795 | P >0.05 | 0.0458795 |
| | 227, 227 | 33% | 6% | 100% | 0.0075203 | 0.000001 | 0.000000 |
| | 227, 231 | 13% | 0% | 0% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 227, 243 | 0% | 12% | 0% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| FHC2979 | 268, 268 | 29% | 18% | 4% | P >0.05 | 0.0201368 | P >0.05 |
| | 268, 272 | 50% | 33% | 33% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 268, 276 | 0% | 0% | 13% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 272, 272 | 17% | 36% | 29% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |
| | 272, 276 | 4% | 12% | 17% | P >0.05 | P >0.05 | P >0.05 |

Por otro lado, y con el fin de determinar la segregación independiente entre los diferentes loci, se determinó el desequilibrio genotípico (DG), a través del programa *FSTAT V 1.2* (Goudet, 1995) empleando para ello 135 mil permutaciones. El Cuadro 14, muestra que no existe DG, en ningún loci, ni en ninguna variante, empleando valores nominales de 5%, 1% y 0.1%.

Cuadro 14

Desequilibrio genotípico de los diez loci estudiados para las tres variedades de la raza Gran Danés

| TABLA DE DESEQUILIBRIO LIGAMIENTO | | | | |
|-----------------------------------|-----------|---------|---------|---------|
| LOCUS | AMERICANA | CRIOLLA | EUROPEA | TOTAL |
| PEZ1 X FHC205 | 0.48629 | 0.11068 | 0.11068 | 0.19995 |
| PEZ1 X FHC201 | 0.15310 | 0.67631 | 0.67631 | 0.04619 |
| PEZ1 X PEZ5 | 0.19264 | 1.00000 | 1.00000 | 0.18103 |
| PEZ1 X PEZ20 | 0.78761 | 0.87450 | 0.87450 | 0.77063 |
| PEZ1 X PEZ12 | 0.08201 | 0.72058 | 0.72058 | 0.30625 |
| PEZ1 X PEZ3 | 0.23855 | 0.75849 | 0.75849 | 0.75420 |
| PEZ1 X PEZ6 | 0.34540 | 0.53878 | 0.53878 | 0.15122 |
| PEZ1 X PEZ8 | 0.39788 | ND | ND | 0.41126 |
| PEZ1 X FHC207 | 0.05050 | 0.97788 | 0.97788 | 0.00789 |
| FHC205 X FHC201 | 0.52791 | 0.29555 | 0.29555 | 0.05754 |
| FHC205 X PEZ5 | 0.16965 | 0.38634 | 0.38634 | 0.43448 |
| FHC205 X PEZ20 | 0.22976 | 0.33956 | 0.33956 | 0.18593 |
| FHC205 X PEZ12 | 1.00000 | 0.14572 | 0.14572 | 0.03885 |
| FHC205 X PEZ3 | 0.64761 | 0.74909 | 0.74909 | 0.46881 |
| FHC205 X PEZ6 | 0.22497 | 0.50779 | 0.50779 | 0.30794 |
| FHC205 X PEZ8 | 0.37201 | ND | ND | 0.49948 |
| FHC205 X FHC207 | 0.26697 | 0.83656 | 0.83656 | 0.05449 |
| FHC201 X PEZ5 | 0.99190 | 0.95194 | 0.95194 | 0.99426 |
| FHC201 X PEZ20 | 0.29633 | 0.02298 | 0.02298 | 0.12367 |
| FHC201 X PEZ12 | 0.74119 | 0.29156 | 0.29156 | 0.62398 |
| FHC201 X PEZ3 | 0.25432 | 0.64636 | 0.64636 | 0.68062 |
| FHC201 X PEZ6 | 0.26232 | 0.36129 | 0.36129 | 0.65699 |
| FHC201 X PEZ8 | 0.10079 | ND | ND | 0.14716 |
| FHC201 X FHC207 | 0.84808 | 0.01721 | 0.01721 | 0.00086 |
| PEZ5 X PEZ20 | 0.48328 | 0.93442 | 0.93442 | 0.97177 |
| PEZ5 X PEZ12 | 0.81514 | 0.00282 | 0.00282 | 0.05437 |
| PEZ5 X PEZ3 | 0.81579 | 0.88621 | 0.88621 | 0.74296 |
| PEZ5 X PEZ6 | 0.08841 | 0.20399 | 0.20399 | 0.03376 |
| PEZ5 X PEZ8 | 0.03102 | ND | ND | 0.16097 |
| PEZ5 X FHC207 | 0.58760 | 0.18198 | 0.18198 | 0.04291 |
| PEZ20 X PEZ12 | 0.19398 | 0.99977 | 0.99977 | 0.96293 |
| PEZ20 X PEZ3 | 0.74854 | 0.82505 | 0.82505 | 0.61852 |
| PEZ20 X PEZ6 | 0.03583 | 0.00902 | 0.00902 | 0.00307 |
| PEZ20 X PEZ8 | 0.48294 | ND | ND | 0.73401 |
| PEZ20 X FHC207 | 0.04035 | 0.16457 | 0.16457 | 0.08168 |
| PEZ12 X PEZ3 | 0.66395 | 0.84435 | 0.84435 | 0.31102 |
| PEZ12 X PEZ6 | 0.35469 | 0.99364 | 0.99364 | 0.70594 |
| PEZ12 X PEZ8 | 0.74209 | ND | ND | 0.52982 |
| PEZ12 X FHC207 | 0.93681 | 0.72115 | 0.72115 | 0.82464 |
| PEZ3 X PEZ6 | 0.24792 | 0.10908 | 0.10908 | 0.21570 |
| PEZ3 X PEZ8 | 0.00959 | ND | ND | 0.00637 |
| PEZ3 X FHC207 | 0.70825 | 0.87274 | 0.87274 | 0.58210 |
| PEZ6 X PEZ8 | 0.00275 | ND | ND | 0.01676 |
| PEZ6 X FHC207 | 0.13264 | 0.84554 | 0.84554 | 0.23090 |
| PEZ8 X FHC207 | 0.54475 | ND | ND | 0.36510 |

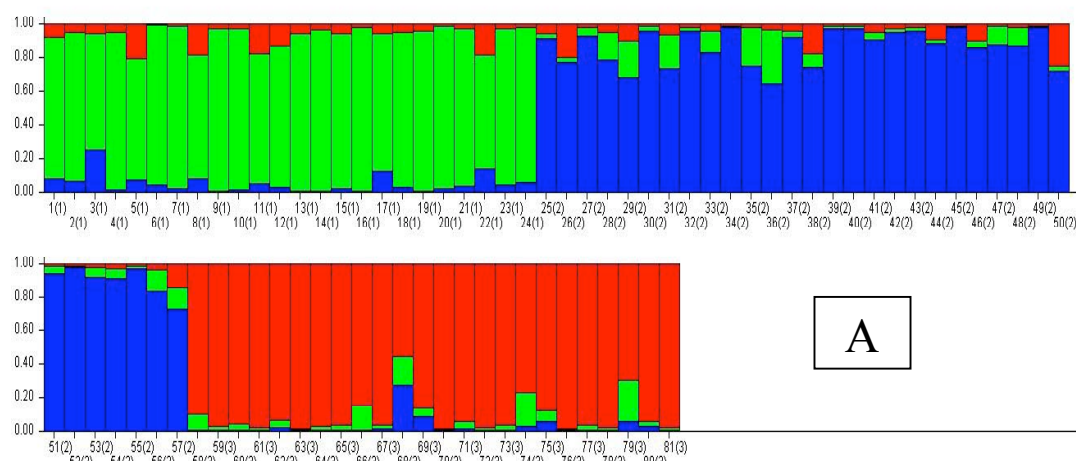
*Valores de P por 5% nivel nominal : 0.000056

*Valores de P por 1% nivel nominal : 0.000011

*Valores de P por 0.1% nivel nominal : 0.000001

Determinación de la Estructura genética

Finalmente y a pesar de que nuestra población se encuentra en equilibrio con HW, se determinó la estructura genética con el fin de definir si los individuos de la nueva variante Criolla constituía una nueva población o si se encontraban repartidos entre las variantes Americana y Europea, además de determinar la carga ancestral (porcentaje Americana y/o Europeo), de cada individuo perteneciente a la variante Criolla. Para ello se emplearon 700 mil cadenas Markov Monte Carlo (MCMC), a través del programa *Structure V.2.3.3* (Pritchard et al., 2010); encontrando que las tres variantes estudiadas presentaron una $p=1$, de constituir tres variedades genéticamente distintas (Figura 6A); las cuales presentaban diferentes características ancestrales (esto se determinó empleando controles internos por variedad), de tal suerte que la variante Europea estaba constituida por una mayor carga genética representativa de esta variante, la Americana por características genéticas específicas de esta variante, mientras que la variante Criolla estuvo representada por características genéticas de las variantes Americana y Europea, pero también por características genéticas propias de la variante Criolla (Figura 6 A y B)



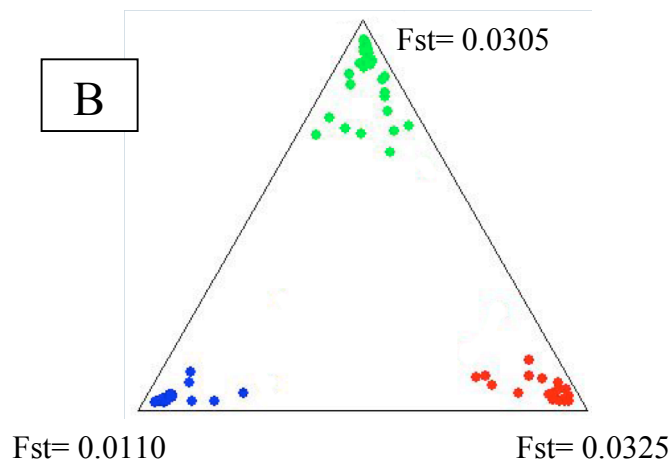


Figura 6 .Representación de la estructura genética mediante gráficos de barras y de triángulo: A) Identificación de la estructura genética para cada uno de los ejemplares estudiados según su carga ancestral. Con la gama de Cromatografía (rojo ancestría Criolla, verde Americana y azul Europea) se puede observar el porcentaje contenido de carga genética dentro de cada uno de los ejemplares estudiados. Así mismo en la B) Gráfica de triángulo podemos identificar perfectamente a cada individuo en su variedad separando estas perfectamente una de otra

Los resultados obtenidos por el programa *Structure V.2.3.3* (Pritchard et al., 2010) se compararon con los datos del registro de identificación de cada uno de los individuos, demostrando su confiabilidad. Al corroborar la ancestría genética de cada uno de los ejemplares, así como se observó que algunos ejemplares que habían sido catalogados como en su registro inicial como pertenecientes a una variedad específica, en realidad su ancestría genética era otra. (Anexo 5).

Análisis de Componentes Factoriales

Con el fin de reducir el número de variables que pudieran afectar la dimensionalidad del conjunto de datos y buscar una proyección que permita representar los datos y explicar la variabilidad de los mismos, decidimos realizar un análisis de componentes factoriales (ACF), mediante el programa GENETIX v 4.05 (Belkhir K BP, 1996-2004) (Figura 7), encontrando que las tres variantes se encuentran

separadas espacialmente entre ellas, manteniéndose cada una como una variedad genética independiente

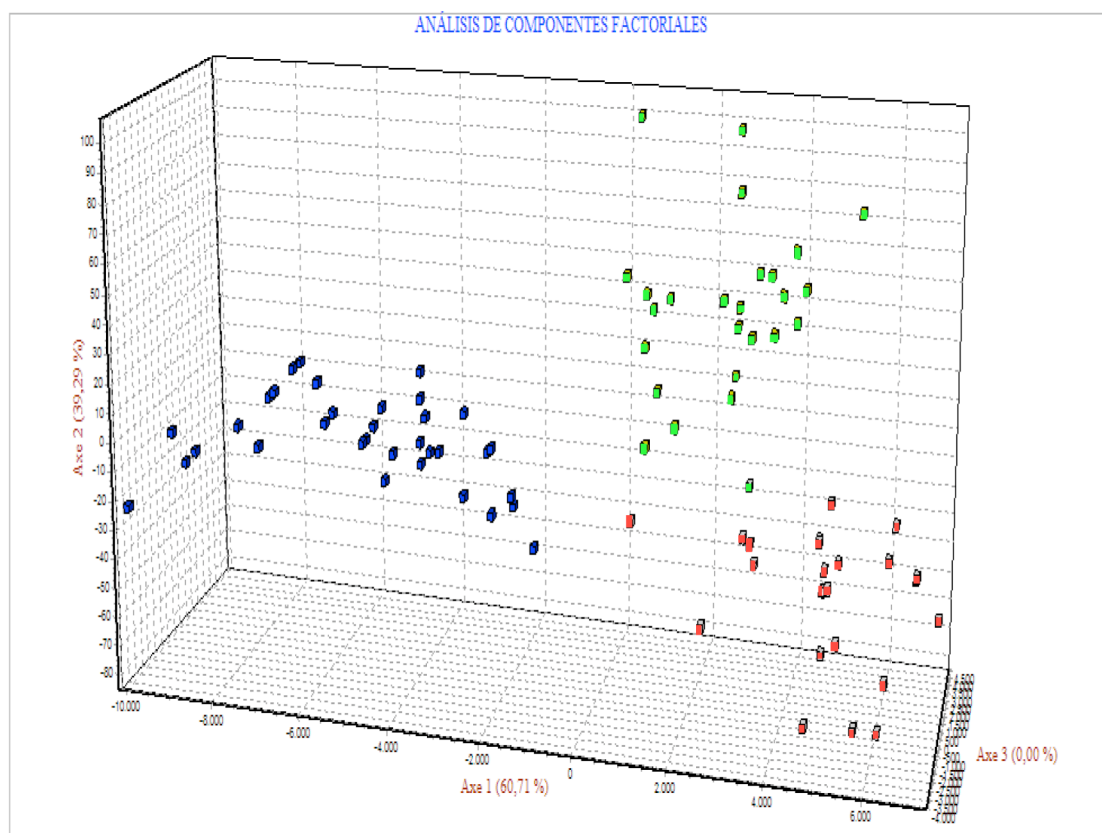


Figura 7- Análisis de componentes Factoriales de la tres variedades genéticas del Gran Danés. Se puede observar el comportamiento de las tres variedad dentro de la grafica donde notamos que la población Criolla (color rojo) esta concentrada al lado derecho, debajo de la variedad Americana (verde; mientras la variedad Europea (azul) se encuentra concentrada en el lado Izquierdo.

Filogenia

Con el fin de validar la formación de esta nueva variante Criolla como una variedad independiente y no como una mezcla intermedia de las variantes Americana y Europea, se realizó un estudio filogenético empleando el método de Neighbor joining (NJ), basado en un matriz de distancias genéticas construidas a través de la ecuación de Nei (cuadro 16) (Nei, 1973), a través de la cual se busca una relación

ancestral entre las diferentes poblaciones. De esta forma se encontró (Figura 8), que la variante Criolla está constituida como una variante independiente desde hace tiempo y que comparte ancestría común con la variante Americana, la cual a su vez procede de la variante Europea, que corresponde a la variante ancestral.

Cuadro 16

Distancias Genéticas (Fst) entre las variedades Genéticas del Grand Danés

| Distancias Genéticas (FST) entre las tres Variedades Genéticas del Grand Danés | | | |
|--|-----------|---------|---------|
| | Americana | Criolla | Europea |
| Americana | * | 0.08138 | 0.08559 |
| Criolla | 0.08138 | * | 0.34913 |
| Europea | 0.08559 | 0.34913 | * |

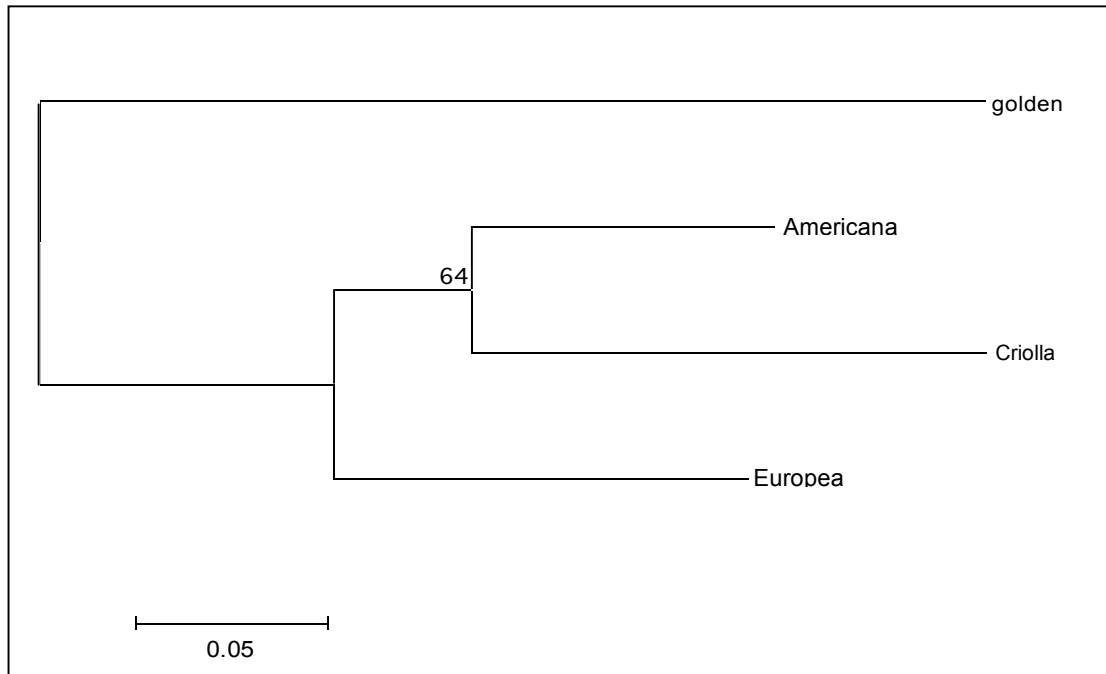


Figura 8. Árbol Filogenético de las tres variedades de la raza Gran Danés. Donde podemos analizar la distancia Filogenética de las tres

variedades genéticas de la raza Gran Danés, comparada contra una población de Cobradores de Labrador Dorados (Golden Retrievers).

Variabilidad Genética del Criadero Comercial contra una población externa.

Frecuencias alélicas

Las frecuencias de distribución alélica de la población del criadero comercial fueron comparadas con una población abierta. La Figura 9 muestra los alelos más frecuentes encontrados en las dos poblaciones, pudiendo observar que el alelo 122 del locus PEZ 1 presentó una frecuencia del 71% en el Criadero y del 58% en la población externa ($p= 0.0493832$). Por lo que respecta al locus FHC2054, los alelos 157 y 161 resultaron ser los más frecuentes en las dos variedades poblacionales, siendo el alelo 157 más frecuente en la población del criadero ($p= 0.0098967$), mientras que el alelo 6 resultó ser más frecuente en la población abierta ($p= 0.0018643$).

Para el caso del locus PEZ5, el alelo 101 resultó ser el más frecuente, encontrándose en el 75% de la población externa y en el 59% en la población del criadero ($p= 0.0170798$). Por lo que se refiere al locus PEZ20, el alelo 175 se presentó en el 78% de la población del criadero y en el 65% en la población externa, por lo que la comparación entre las frecuencias de ambas poblaciones mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.045918$).

Con respecto al locus PEZ12, este resultó ser el más polimórfico y por ende el más informativo, presentando 301 alelos diferentes; de los cuales el alelo 301 resultó ser el más frecuente, presentándose en el 45% de la población del criadero y en el 28% de la población externa ($p= 0.0082159$).

Por lo que se refiere a los loci PEZ3, PEZ6, PEZ8 y FHC2079, se pudo observar que los alelos 118, 124 y 134; 171 y 199; 219, 223, 227 y 247; y 272 y 276 resultaron ser los más frecuentes, en forma

respectiva. Al comparar las frecuencias entre las dos poblaciones, los alelos 124 y 134 (PEZ3) y 223 y 247 (PEZ8) resultaron ser los más frecuentes de la población de criadero mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$). Por su parte los alelos 118 (PEZ3), 171 y 199 (PEZ6) y 219 y 223 (PEZ8) fueron representativos de la población abierta ($P < 0.05$). Por último FHC2079, el alelo 272 se presentó en el 61% en la población externa ($P = 0.0183755$) y el 276 en el 13% de la población del Criadero ($P = 0.0101713$).

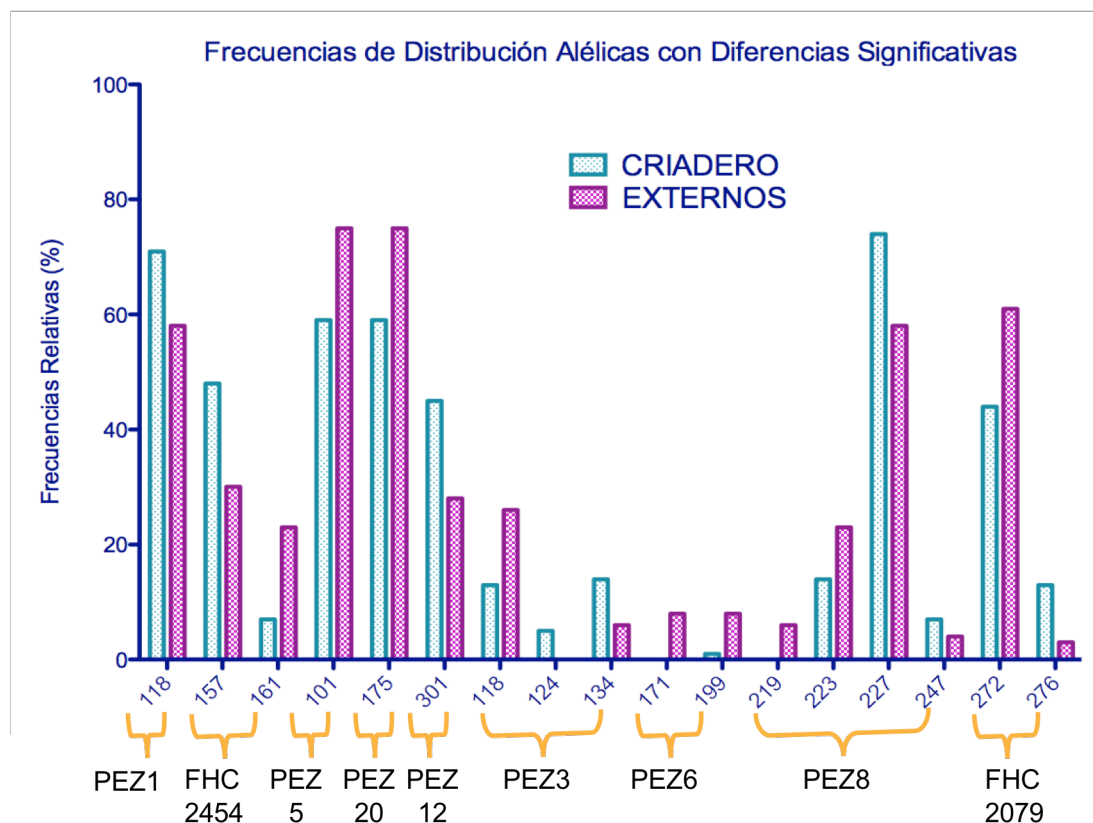


Figura 9 Frecuencias de distribución alélica de los diez loci estudiados en las poblaciones del Criadero y Externa

Para la determinación del equilibrio con respecto a la ecuación matemática de Hardy-Weinberg (HW), se emplearon los tres métodos mencionados anteriormente, además de que se realizó la corrección de Bonferroni ($P = 0.0167$) con el fin de evitar algún error estadístico. Por lo que respecta a la población externa, se observó que ésta se encuentra en equilibrio HW ($P = 0.0313$), mientras que la población del criadero presentó un desequilibrio importante ($P = 0.0002$)(Cuadro 15).

Cuadro 15

Resumen de los Índices de Estadística genética descriptiva de los 10 loci para las poblaciones del Criadero y externa

| | PEZ1 | | FHC2054 | | FHC2010 | | PEZ5 | | PEZ20 | | PEZ12 | | PEZ3 | | PEZ6 | | PEZ8 | | FHC2079 | |
|--------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
| | CRIA | EXTER | CRIA | EXTER | CRIA | EXTER | CRIA | EXTER | CRIA | EXTER | CRIA | EXTER | CRIA | EXTER | CRIA | EXTER | CRIA | EXTER | CRIA | EXTER |
| k | 5 | 5 | 8 | 9 | 6 | 5 | 3 | 4 | 5 | 4 | 10 | 13 | 8 | 7 | 5 | 8 | 6 | 7 | 3 | 3 |
| GD | 0.524 | 0.416 | 0.759 | 0.718 | 0.665 | 0.637 | 0.448 | 0.411 | 0.538 | 0.486 | 0.853 | 0.760 | 0.767 | 0.755 | 0.787 | 0.743 | 0.591 | 0.421 | 0.554 | 0.579 |
| Ho | 0.3488 | 0.6000 | 0.6512 | 0.6667 | 0.5581 | 0.6667 | 0.3953 | 0.4333 | 0.3953 | 0.4667 | 0.7674 | 0.8000 | 0.6977 | 0.7500 | 0.6512 | 0.6512 | 0.3488 | 0.6333 | 0.5349 | 0.5167 |
| He | 0.4543 | 0.6053 | 0.6579 | 0.7656 | 0.6368 | 0.6674 | 0.5649 | 0.4099 | 0.3651 | 0.5211 | 0.7372 | 0.8237 | 0.7723 | 0.7603 | 0.7244 | 0.6500 | 0.4210 | 0.6064 | 0.6033 | 0.5004 |
| HW*(P) | 0.0319 | 0.4732 | 0.4829 | 0.0341 | 0.1339 | 0.5137 | 0.1686 | 0.7636 | 0.7988 | 0.1474 | 0.7286 | 0.2925 | 0.1047 | 0.4238 | 0.1452 | 0.0092 | 0.0706 | 0.7291 | 0.1850 | 0.6338 |
| G | 15 | 15 | 36 | 45 | 21 | 15 | 6 | 10 | 15 | 10 | 55 | 91 | 36 | 28 | 15 | 36 | 21 | 28 | 6 | 6 |
| T | 43 | 60 | 43 | 60 | 43 | 60 | 43 | 60 | 43 | 60 | 43 | 60 | 43 | 60 | 43 | 60 | 43 | 60 | 43 | 60 |
| T' | 86 | 120 | 86 | 120 | 86 | 120 | 86 | 120 | 86 | 120 | 86 | 120 | 86 | 120 | 86 | 120 | 86 | 120 | 86 | 120 |

| <i>Estadística genética descriptiva estadística de los diez 10</i> | | |
|--|-------------------------|-----------------|
| <i>POBLACIONES</i> | <i>P HARDY-WEINBERG</i> | Θ |
| <i>CRIADERO</i> | <i>0.0002</i> | <i>0.110743</i> |
| <i>EXTERNA</i> | <i>0.0313</i> | <i>0.047103</i> |

k= alelos, GD= Diversidad Genética, Ho= Homocigotos observados, He= Heterocigotos observados, HW*(P)= Hardy-Weinberg (Fisher's), G=diferentes genotipos; T= total (Nº individuos); T'= total alelos; Θ = Coeficiente de Endogamia

Frecuencias Genotípicas

Con respecto a las frecuencias genotípicas, en la Figura 10 se resumen las que presentaron diferencias significativas entre las poblaciones. Para el caso del locus PEZ1, el genotipo más frecuente fue el (118,118) presentándose en el 53 % de la población del criadero y en el 24% de la población externa ($P=0.0007975$); y los genotipos (110,118), (114,122) y (118,122) representaron el 18% ($P=0.024875$), 12 % ($P=0.0292262$), y 24% ($P=0.0089520$) de la población externa, respectivamente.

Por lo que respecta al locus FHC2054, el genotipo más frecuente fue el (157,157), encontrado con mayor frecuencia en la población del criadero (21% y 5%) en comparación con la externa, mostrando una diferencias significativa ($P=0.0291992$). Así mismo, para el locus FHC2010, los genotipos (223,235) y (235,235) fueron los más frecuentes; para el caso del genotipo (223,235), éste representó al 32% de la población externa y al 30% de la población del criadero, mientras que el genotipo (235,235) se encontró en el 21% de la población del criadero y en el 18% de la población externa, sin mostrar diferencias significativas.

En lo relativo a los loci PEZ5 y PEZ20, los genotipos más frecuentes fueron (105,105); y (253,263). En lo referente al locus PEZ5, el genotipo (105,105) fue el más frecuente, presentándose en el 16% de la población del criadero y 2% de la población externa ($P=0.0126256$). Por lo que respecta al locus PEZ20, el genotipo (253,263) se presentó en el 28% en la población del criadero y 20% en la externa sin presentar diferencia significativa. Por su parte los genotipos (118,126), (122,126) y (126,126) fueron los más frecuentes del locus PEZ3, sin mostrar diferencias significativas entre ambas poblaciones. Para el genotipo (118,126), éste se encontró en el 17% de la población externa y en el 12% de la población del criadero; mientras que para el genotipo (122,126), éste representó 16% de la población del criadero y

el 15% en la población externa. Por último el genotipo (126,126) se presentó en una frecuencia del 12% en población del criadero y 5% en la población externa.

Por lo que se refiere al PEZ6, los genotipos mas frecuentes fueron el (179,179), (179,195) y (185,185). El genotipo (179,179) solo se presentó en la población del criadero (12%), ($P=0.0108317$). El (179,195) se presentó con mayor frecuencia en la población del criadero (14% y 2%) $P=0.0241674$, y el (185,185) se encontró solo en la población externa 14% (0.0139511).

Por lo que respecta a los loci PEZ8 y FHC2079 se observó que para el locus PEZ8, el genotipo (223,227) se encontró en el 35% de la población externa y en el 12% de la población del criadero ($P=0.0344949$); mientras que el genotipo (227,227) se presentó en 63% de la población del criadero y en el 30% de la población externa ($P=0.0314197$). Por lo que se refiere a los genotipos del locus FHC2079, el genotipo (272,272) se presentó en el 21% de la población del criadero y en el 35% de la población externa sin mostrar diferencias significativas.

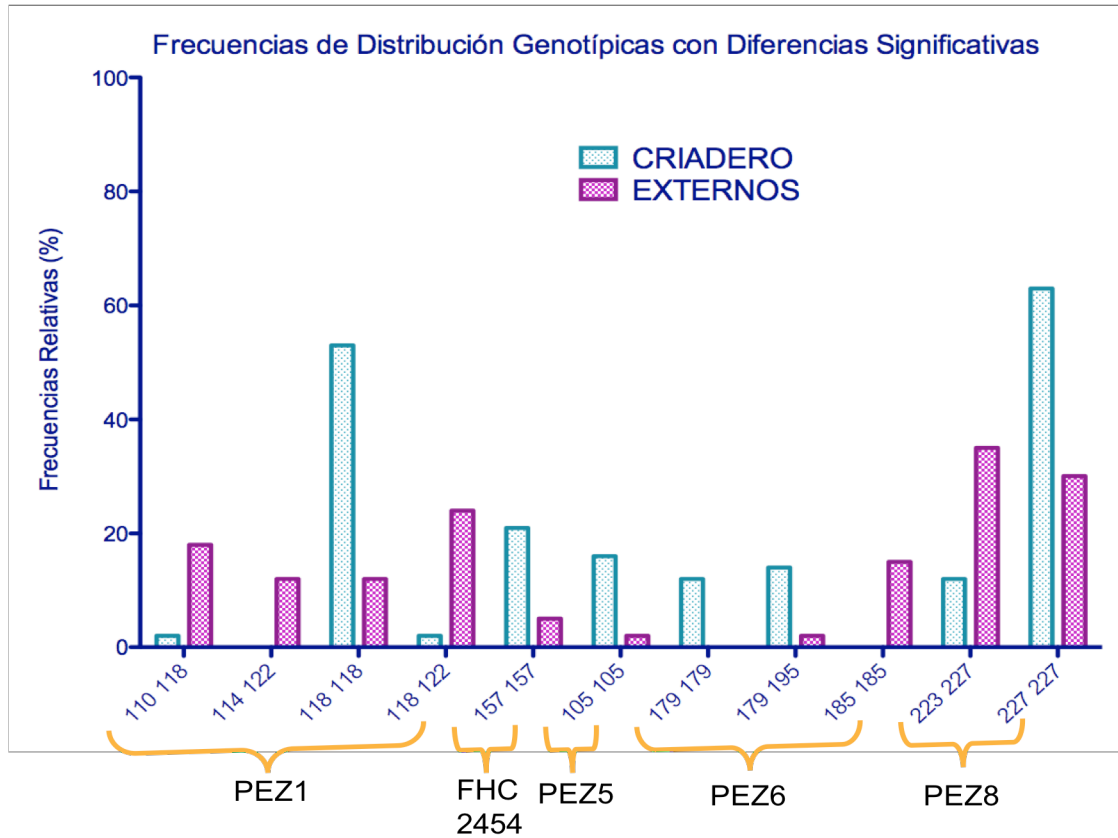


Figura 10.- Frecuencias de distribución genotípica de los diez loci estudiados en las poblaciones del Criadero y Externa con diferencias significativas.

Filogenia

Con el fin de conocer como estaban constituidas la poblaciones estudiadas, se realizó un estudio filogenético empleando el método de Neighbor joining (NJ), buscando establecer una relación ancestral entre las dos poblaciones. Como resultado (Figura 11), se puede observar que la población del criadero comercial estudiado comparte ancestría genética con la variante Criolla, así como con la variante Europea. Así mismo la población externa presenta una carga genética con mayor tendencia hacia la población Americana.

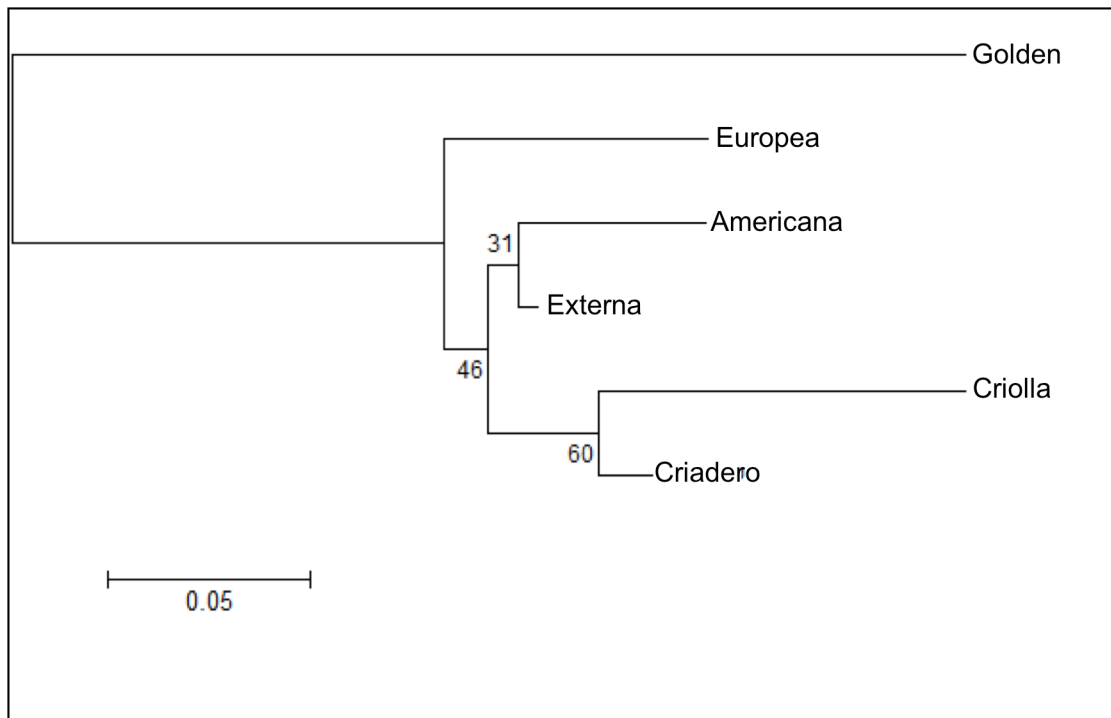


Figura 1. Árbol filogenético de las variedades y poblaciones estudiadas: donde se pueden ver a las poblaciones del Criadero y la Externa como poblaciones separadas y comparadas con su ancestría entre las tres variedades genéticas, notando que el criadero comercial se encuentra más cercano a la variedad Criolla, mientras que la Externa presenta mayor cercanía con la Americana.

8. DISCUSIÓN

A partir del año 2003 se logró obtener la secuencia parcial del genoma del caniche estándar que conforma cerca del 80% del genoma del *Canis familiaris*, lo que aunado con la secuencia de la raza Bóxer dio lugar a la secuencia canina de referencia (Botstein et al., 1980, Boyko et al., 2009, Cardon and Palmer, 2003). Lo anterior ha permitido no sólo conocer parte del genoma del perro, sino también estudiarlo a través de las variantes polimórficas que permiten dilucidar su estructura genética, la variación entre razas, entre poblaciones y dentro de la misma población (intrapoblacional), por lo que la genética de poblaciones constituye una herramienta indispensable para comprender las funciones intra e interraciales de las modificaciones genéticas caninas.

En este estudio comprobamos que los marcadores autosómicos tipo microsatélite (STR) son la herramienta más útil en la descripción de la variación genética entre razas (Irion et al., 2003), pero también permiten discriminar genéticamente variedades de la misma raza. Para este caso particular, los marcadores STR permitieron discriminar las tres variedades (Americana, Criolla y Europea) de la raza Gran Danés, al mismo tiempo que se establecieron las características ancestrales de cada individuo. Lo anterior se llevó a cabo gracias a que estos marcadores presentan un elevado polimorfismo genético, mostrando una riqueza alélica promedio cercano a 5 y dando origen a un número de genotipos promedio de ≈ 22 por locus, lo que aportó una diversidad genética promedio de 0.62.

Del mismo modo, los STRs permitieron establecer la validación estadística para determinar las relaciones genéticas de parentesco, no obstante observamos que en los loci estudiados existen algunos que son más informativos (PEZ12, PEZ3 y PEZ6), mientras que otros no lo son tanto (PEZ1, PEZ5 y FHC2079). Sin embargo, el empleo de los diez marcadores en conjunto mostraron tener la capacidad promedio

para discriminar genéticamente a un individuo en 110,092, con un poder de discriminación muy cercano a 1 (0.999990916). Estos precedentes tienen ventajas en pruebas de paternidad en las que un ejemplar relacionado genéticamente con otro tiene 29 veces más probabilidad de ser el padre biológico de un ejemplar, que uno que no tienen relación biológica con éste (TPI).

Los cálculos de estadística forense y de paternidad implican que la población de estudio se encuentra en equilibrio con la ecuación matemática de Hardy-Weinberg (HW), así como en equilibrio de ligamiento (LE), lo que permitió determinar las características poblacionales, tales como la estructura genética. De forma individual se encontró que las tres variantes estudiadas al igual que las población Externa se encuentran en equilibrio con HW (EHW), a pesar de haber realizado la corrección de Bonferroni (0.0167). Sin embargo, la población del Criadero se encuentra en desequilibrio HW (DHW) mostrando una $P=0.0002$. A este respecto, consideramos que éste desequilibrio puede estar relacionado con el elevado coeficiente de endogamia (*inbreeding*, θ o F_{is}) presente en los criaderos, producto de la fuerte selección artificial que llevan a cabo los criadores en el afán de conseguir perros más “puros”, lo que conlleva a la dominancia de determinados genotipos (efecto fundador) disminuyendo notablemente la diversidad genética y ocasionando lo que se conoce como un cuello de botella, con la consiguiente elevación de la consanguinidad (Cantet, 2010). Esto se comprobó mediante el cálculo del coeficiente θ o F_{is} , el cual para la población del Criadero fue de 0.110743, muy por encima de la población abierta ($\theta=0.047103$), así como de las poblaciones Americana ($\theta=0.0305$), Criolla ($-\theta=0.0325$) y Europea ($\theta=0.0110$). En este contexto, cabe resaltar que la población Criolla, a pesar de mostrar un HWE, presentó un exceso de individuos heterocigotos, lo cual puede explicarse por la baja diversidad alélica ($k=4$ alelos promedio), producto del cuello de botella.

En lo referente a la determinación del desequilibrio de ligamiento (LD), se observó que las variantes Americana, Criolla y Europea se encontraron en equilibrio de ligamiento (EL), ajustando la P al 1% del valor nominal ($P=0.000011$), no obstante aún con el 0.1% de valor nominal (0.000001) todas mostraron un EL. Por lo que se refiere a la comparación entre las poblaciones del criadero contra la población externa encontramos que ésta última se encuentra en EL, mientras que la población del Criadero mostró un LD entre los loci PEZ5 y PEZ8 ($P=0.00000$), lo cual sugerimos, está relacionado con el grado de endogamia.

Hasta aquí, logramos determinar que el análisis del material genético es una poderosa herramienta para verificar las relaciones de parentesco así como la identificación individual de animales (Dayton et al., 2009), además de que los pánels de marcadores que se encuentran disponibles en el mercado (*StockMarks® Dog Genotyping Kit de Applied Biosystems*), son lo suficientemente útiles para los propósitos que se pretendían en este trabajo. No obstante, la determinación de la estructura genética de las poblaciones, resulta un aspecto fundamental en los estudios poblacionales, por lo que tomando en cuenta que se pretendía saber si la variabilidad genética de cada población era lo suficientemente grande como para distinguir a una variedad de otra (Americana, Criolla y Europea), a pesar de pertenecer a la misma raza, decidimos realizar un análisis de componentes factoriales (AFC), el que mostró que la variante Criolla, pudo haber sido generada de la combinación de apareamientos entre las variantes Americana y Europea, aunque está constituida genéticamente como una variante independiente. A este respecto, decidimos comprobar que cada variante era genéticamente independiente a pesar de pertenecer a la misma raza. Esto se determinó mediante estadística Bayesiana a través de cadenas Monte Carlo Markov (MCMC), las que permitieron determinar la estructura genética usando el programa *Structure v.2.3.3* (Pritchard et al.,

2010), empleando para ello 700 mil simulaciones. El programa determinó que la probabilidad de que existieran tres variantes poblacionales (k): Americana ($F_{ST}=0.0305$), Criolla ($F_{ST}=0.0325$) y Europea ($F_{ST}=0.0110$), era de uno ($P=1$). Este mismo programa permitió distinguir la carga genética para cada individuo (Figura 8), de manera que los individuos pertenecientes a la variedad Americana tenían mucho mayor carga genética de ancestría Americana, en comparación con los individuos Europeos, los que presentaron mayor carga Europea que Americana. Interesantemente, se pudo observar que algunos de los individuos que genéticamente estaban catalogados como Americanos, mostraban un porcentaje significativo de ancestría Criolla, tal es el caso del individuo 58 (Figura 7). De la misma forma, algunos individuos Europeos presentaban un porcentaje genético de ancestría Americana, como es el caso del individuo 81; mientras que algunos individuos presentaban ancestría Criolla, tal es el caso del individuo 59. Por lo que respecta a la población Criolla, encontramos que la variedad genética es independiente a las variedades Americana y Europea, no obstante encontramos que algunos individuos catalogados como Criollos presentaban un porcentaje considerable de ancestría Americana y/o Europea. Por lo anterior, pudimos determinar que nuestro sistema genético no coincidió con el registro de los ejemplares en algunos casos, lo que comprueba que la metodología utilizada en el presente estudio fue lo suficientemente sensible para discriminar a una variedad genética de otra. Sin embargo, y con la finalidad de comprobar las diferencias genéticas entre variedades, se realizó un análisis de diferenciación poblacional mediante estadística Bayesiana (100 mil simulaciones) a través del programa *ARLEQUIN v.3.1*. (Excoffier L, 2005). Este análisis mostró que al comparar las variedades Criolla *vs* Americana, seis de los diez loci estudiados, presentaron diferencias significativas importantes ($P \leq 0.02234$). Por otra parte, al comparar las variedades Criolla *vs* Europea la mitad de los loci estudiados mostraron diferencias muy importantes ($P \leq 0.00084$), inclusive con $P=0.00000$ (Cuadro 17).

Cuadro 17

Análisis de diferenciación poblacional de los diez loci estudiados

| Criollo Mexicano vs Valores de P ±SE | | |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|
| LOCUS | Americano | Europeo |
| PEZ1 | 0.25361 ± 0.0063 | 0.07435 ± 0.0038 |
| FHC2054 | 0.23626 ± 0.0056 | 0.08046 ± 0.0035 |
| FHC2010 | 0.10892 ± 0.0032 | 0.18192 ± 0.0073 |
| PEZ5 | 0.02234 ± 0.0020* | 0.00000 ± 0.0000* |
| PEZ20 | 0.08419 ± 0.0031 | 0.11412 ± 0.0032 |
| PEZ12 | 0.00016 ± 0.0001* | 0.10670 ± 0.0049 |
| PEZ3 | 0.00181 ± 0.0006* | 0.00000 ± 0.0000* |
| PEZ6 | 0.00999 ± 0.0007* | 0.00084 ± 0.0002* |
| PEZ8 | 0.00034 ± 0.0002* | 0.00000 ± 0.0000* |
| FHC2079 | 0.01649 ± 0.0012* | 0.24463 ± 0.0050 |
| TOTAL | 0.05964 ± 0.0011 | 0.00003 ± 0.0000* |

Nivel de Significacncia = 0.0500

longitud de las Cadenas de Markov = 100000 pasos

Finalmente, esto fue validado filogenéticamente mediante la construcción del dendrograma (árbol filogenético) empleando el método de Neighbor-joining (NJ), el cual fue construido a partir de las distancias genéticas estándar (D_A) (Nei 1973) usando el programa POPTREE2 (Takezaki et al. 2009) y empleando 500 mil simulaciones. El dendrograma corroboró que la variedad Criolla aparece en el mismo lado de la variedad Americana, pero como una población independiente, y ambas variedades (Americana y Criolla) compartiendo ancestría con la variedad de la cual descienden, es decir de la Europea.

A manera de resumen consideramos que la determinación de la estructura poblacional, así como los estudios de filogenia son un factor importante por lo que a los estudios de asociación se refiere, ya que la ausencia de dichas determinaciones puede conllevar a la presencia de asociaciones erróneas (Cardon and Palmer, 2003; Marchini et al., 2004). La estructura de las razas de perros ha sido comúnmente estudiada, sin embargo factores adicionales como la

estructura genética entre las diferentes razas no ha sido suficientemente investigada. Este tipo de estudios resulta relevante, sobre todo en los programas de cruzamiento realizados por los criadores, ya que como se ha demostrado en el presente trabajo, la ausencia de la determinación, por lo que a los aspectos poblacionales se refiere (frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas), puede llevar a la formación de poblaciones crípticas de mayor susceptibilidad a enfermedades por el alto índice de endogamia que presentan. Así, la estructura poblacional resulta una característica genealógica adyacente que no sólo avala la pureza de una raza, sino que también constituye un factor importante por lo que a la salud genética de la raza se refiere. Esto permitirá mantener los aspectos estándares de la raza, sin dejar de lado la importancia de mantener buenos grados de diversidad genética, que desde el punto de vista evolutivo resultan muy importantes. Así, los estudios genéticos mediante el empleo de marcadores polimórficos permiten estudiar las diferentes razas no sólo con fines poblacionales (Ichikawa et al., 2008; Parker et al., 2004), sino también con fines reproductivos, en los que se conocen las características ancestrales y estructurales del semental y por ende su contribución genética a la descendencia como lo muestran los estudios realizados por Ichikawa y Cols (Ichikawa et al., 2008), además de que permiten una identificación genética individual estableciendo un método certero de verificación del pedigree (Gorbach et al., 2010). Sin embargo, el impacto de la estructura genética no termina allí, ya que en la actualidad los estudios de asociación genética, en los que se busca determinar las variantes genéticas (mapeo de genes) asociadas con enfermedades comunes (cáncer, enfermedades cardiovasculares, epilepsia, ceguera, sordera, entre muchas otras) se restringen al estudio de ciertas razas o grupos de razas, por lo que la determinación de la estructura genética corresponde a un factor fundamental para validar genéticamente estos estudios, ya que los programas de entrecruzamiento hechos por algunos criadores puede dar origen a la generación de características

fenotípicas específicas, las que a su vez se ven representadas por determinados genotipos. Dichas características genéticas pueden constituir la estructura genética de determinada raza, sin que esto esté relacionado con el fenotipo propio de una enfermedad. Así la comprensión de las relaciones genéticas entre las razas proporciona datos muy importantes que no sólo se relacionan con la descripción forense o de paternidad de una raza, o una variante (Parker and Ostrander, 2005). De la misma forma, las investigaciones relacionadas con los estudios de asociación genética se centran en el estudio de rasgos multigénicos complejos y en la actualidad se emplean para estudios relacionados con fenotipos deportivos, como es el caso del denominado “*Bully whippet*”, el cual presenta una mutación del gen de la miostatina (*MSTM*), lo que da origen a una variante musculosa del whippet, cuyo heterocigoto resulta tener características relacionadas con el fenotipo de corredor más veloz (Mosher et al., 2007). Otro ejemplo lo constituye el estudio de la retinitis pigmentosa ligada a X (XLRP), una de las enfermedades de mayor prevalencia, en la que se han reportado algunos loci STR (CUX20001, CUX30001 y CUX40002) con posible asociación genética en 17 razas de perros, así como en algunas otras variedades (Zangerl et al., 2010). Sin embargo, y tomando en cuenta la gran tendencia por parte de la comunidad científica a realizar estudios de asociación genética en perros y humanos, resaltamos la importancia de la determinación de la estructura genética, así como de otros índices poblacionales que harán más efectivos los programas de cruzamiento entre criadores.

9 CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permitieron determinar la variabilidad genética de la raza Gran Danés en México, constatando que el sistema *Dog StockMarks® Kit de Applied Biosystems* tiene un alto poder de discriminación, al corroborar que las diferencias fenotípicas que existen dentro de la raza, arbitrariamente llamadas variedades (Americana, Criolla y Europea), presentan características genotípicas independientes constituyéndolas como variedades genéticas auténticas. La presente tesis establece el primer trabajo relacionado con la raza Gran Danés en el que se caracteriza filogenética y estructuralmente a la raza, sentando las bases para posteriores estudios en medicina veterinaria y zootecnia que permitan comprender más a fondo la diversidad genética de la misma. Esto abre las puertas para realizar estudios detallados sobre la crianza, las enfermedades y los trastornos a los que esta raza puede ser susceptible.

Por otra parte los marcadores empleados en este estudio nos dieron una nueva visión del manejo genético en los apareamientos en la crianza especializada de las razas puras, demostrando que los registros de crianza basados en aspectos empíricos no siempre reflejan la información genética del ejemplar en cuestión, afectando la crianza selectiva, ya que el sistema de registros no es tan específico como aparenta ser.

Finalmente, este estudio reafirma la utilidad de la genética de poblaciones como una herramienta fundamental para establecer mejores sistemas de crianza, basados en el conocimiento de la estructura genética de las razas, validando con ello el registro (pedigree genético) ancestral de cada uno de los ejemplares. Esta información nos brinda una visión más clara al conocimiento y manejo genético de la raza Grand Danés, permitiendo una mayor comprensión de los cuestionamientos referentes a la existencia de sus

diferentes variedades, proporcionando una visión más real y detallada para la aplicación de su crianza en México y a su vez brindar la misma expectativa a nivel mundial.

Así mismo, la existencia de la variedad Criolla del Gran Danés, llamando la atención que con base en este estudio, esta variedad presenta una mayor relación con la variedad. La variedad Criolla actualmente abre una nueva posibilidad de manejo reproductivo, aportando una mayor diversidad genética y por consiguiente podría ayudar al control y disminución de enfermedades hereditarias causadas y ligadas al manejo endogámico de la crianza no controlada.

10 PERSPECTIVA

Esta tesis abre la posibilidad de la validación genética de las diferentes razas de perros domésticos a través del uso de métodos moleculares de vanguardia, que permiten corroborar la pureza racial y evitar con ello las cruzas endogámicas que podrían afectar la morfología de la raza, modificando sus características fenotípicas y con ello disminuyendo su función zootécnica.

Asimismo, es importante destacar el gran alcance que tiene el aprovechamiento de la tecnología de los marcadores genéticos, tipo microsatélites, para conocer el grado de diversidad genética y de consanguinidad que existe en otras razas de perros de interés en México.

Por otra parte, el estudio de la estructura genética en perros nos ayudaría a determinar las variantes genéticas asociadas a enfermedades de determinadas razas siendo gran interés para médicos veterinarios especialistas y criadores especializados en las diferentes razas.

REFERENCIAS

- Ardanaz, M. A. D. (2008) Sobre el Dogo Alemán. El Mundo del perro España Ed. Ayalga,.
- American Kennel Club (Home page on internet) USA. Breed Standards section Inc. all Rights Reserved. 1980; (updated 5 October 2010; cite 2010 November 7). Available from: www.akc.com
- Bandelt H-J, F. P., Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies., Mol Biol Evol.
- Becker, F. (2005) The Great Dane Embodying a full Exposition of the History Breeding principles, education and present state of the breed. Ed. Read Books.
- Belkhir K. BP, C. L., Raufaste N, and Bohomme F. (Computer program) GENETIX 4.05, (2004) logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier,.
- Boyko, A. R., Boyko, R. H., Boyko, C. M., Parker, H. G., Castelhamo, M., Corey, L., Degenhardt, J. D., Auton, A., Hedimbi, M., Kityo, R., Ostrander, E. A., Schoenebeck, J., Todhunter, R. J., Jones, P. & Bustamante, C. D. (2009) Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. Proc Natl Acad Sci U S A, 106, 13903-8.
- Calboli, F. C., Sampson, J., Fretwell, N. & Balding, D. J. (2008) Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. Genetics, 179, 593-601.
- Cantet, R. J. (2010) Statistical methods in animal breeding and Bach's harpsichord concertos. J Anim Breed Genet, 127, 334-5.

- Cardon, L. R. & Palmer, L. J. (2003) Population stratification and spurious allelic association. *Lancet*, 361, 598-604.
- Crowley, J. B. A. E. (1998) *The complete Dog book*; Official Publication of the American Kennel Club, New York: Ed. Howell Book House.
- Dangerfield, Stanley y Elsworth Howell. (1973) *International Encyclopedia of dogs*. Howell Book House, Inc. New York. 480 pgs. (ISBN: 0-87605-623-0).
- Dayton, M., Koskinen, M. T., Tom, B. K., Mattila, A. M., Johnston, E., Halverson, J., Fantin, D., Denise, S., Budowel, B., Smith, D. G. & Kanthaswamy, S. (2009) Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material. *Croat Med J*, 50, 268-85.
- Deschampas, M., Band, P. R., Hislop, T. G., Clarke, H. F., Smith, J. M. & To Yee Ng, V. (1992) Barriers to cervical cytology screening in native women in British Columbia. *Cancer Detect Prev*, 16, 337-9.
- DeNise S, Johnston E, Halverson J, Marshall K, Rosenfeld D, McKenna S, et al. (2004) Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American Kennel Club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Anim Genet*, 35, 14-7.
- Gerda M. Umlauff, Muriel Osborne, Anne Fitzgerald, Peggy Cseitz, J. Wen Lundeen, and John G. Me. Edward. (1987) *The New Complete Great Dane Book*. New York: Ed Howell Book, House,.
- Excoffier L, L. G., Schneider S. (Computer Program) Arlequin (version 3.0): (2005) An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*.

- Federacion Cinológica Internacional (Home page on internet) Bélgica. Breed Standars section Inc. Federacion Cinológica Internacional all Rights Reserved. 1988; (updated 2 November 2010; cite 2010 November 7). Available from: www.fci.com
- Fredholm, M. & Wintero, A. K. (1995) Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mamm Genome*, 6, 11-8.
- Galibert, F. & Andre, C. (2008) The dog: A powerful model for studying genotype-phenotype relationships. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 3, 67-77.
- Gómez, M. D. R. Diversidad genética de los loci microsatélites y minisatélites usados en la identificación de individuos en la población mestiza mexicana. México. D.F. Tesis Maestría (1998)., Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional. México. D.F.
- Gorbach, D. M., Makgahlela, M. L., Reecy, J. M., Kemp, S. J., Baltenweck, I., Ouma, R., Mwai, O., Marshall, K., Murdoch, B., Moore, S. & Rothschild, M. F. (2010) Use of SNP genotyping to determine pedigree and breed composition of dairy cattle in Kenya. *J Anim Breed Genet*, 127, 348-51.
- Gómez M. D., Mendez-Buxandera, A., Valera, M. & Molina, A. (2009) Estimation of genetic parameters for racing speed at different distances in young and adult Spanish Trotter horses using the random regression model. *J Anim Breed Genet*, 127, 385-94.
- Goudet, J. (2002) *Fstat*. In., 2.9.3.2 edn. Institute of Ecology, Biology Building, UNIL, CH-1015, Laussane, Switzerland.; 2002.
- Great Dane Club of America. [homepage on the Internet], USA Heath and Welfare section. 2003; [updated 2010 October 16; cited 2010 November 7]. Available from: <http://www.gdca.org/>

- Ichikawa, S., Koller, D. L., Curry, L. R., Lai, D., Xuei, X., Pugh, E. W., Tsai, Y. Y., Doheny, K. F., Edenberg, H. J., HUI, S. L., Foroud, T., Peacock, M. & Econs, M. J. (2008) Identification of a linkage disequilibrium block in chromosome 1q associated with BMD in premenopausal white women. *J Bone Miner Res*, 23, 1680-8.
- Irion, D. N., Schaffer, A. L., Famula, T. R., Eggleston, M. L., Hughes, S. S. & Pedersen, N. C. (2003) Analysis of genetic variation in 28 dog breed populations with 100 microsatellite markers. *J Hered*, 94, 81-7.
- Lewis PO, Zaykin D (2001) Genetic Data Analysis: Computer Program for the Analysis of Allelic Data. Version 1.1. Free program distributed by the authors over the internet from: <http://www.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>.
- Palmer Joan. (1994) *The Illustrated Encyclopedia of Dog Breeds, USA: The Wellfleet Press*. Edison, New Jersey. 256 pgs. ISBN: 0-7858-0030-1
- Magaña J. Jonathan, Arenas Sordo María de la Luz, Gómez Roció (2009) La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. *Rev Méd Chile*, 137.
- Marchini, J., Cardon, L. R., Phillips, M. S. & Donnelly, P. (2004) The effects of human population structure on large genetic association studies. *Nat Genet*, 36, 512-7.
- MetaMorphix Inc. (Home page on internet) USA. Recent News all Rights Reserved. 2004; (updated 1 January 2011; cite 2011 November 5). Available from: <http://www.canineheritage.com/extras/012607canineheritage.pdf>
- Mosher, D. S., Quignon, P., Bustamante, C. D., Sutter, N. B., Mellersh, C. S., Parker, H. G. & Ostrander, E. A. (2007) A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and

- enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet*, 3, e79.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distances from a small number of individuals. *Genetics*, 89.
- Nielen, A. L., Van Der Beek, S., Ubbink, G. J. & Knol, B. W. (2001) Population parameters to compare dog breeds: differences between five Dutch purebred populations. *Vet Q*, 23, 43-9.
- Ostrander, E. A. & Comstock, K. E. (2004) The domestic dog genome. *Curr Biol*, 14, R98-9.
- Ostrander, E. A. & Kruglyak, L. (2000) Unleashing the canine genome. *Genome Res*, 10, 1271-4.
- Parker, H. G., Kim, L. V., Sutter, N. B., Carlson, S., Lorentzen, T. D., Malek, T. B., Johnson, G. S., Deferance, H. B., Ostrander, E. A. & Kruglyak, L. (2004) Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science*, 304, 1160-4.
- Parker, H. G., Kukekova, A. V., Akey, D. T., Goldstein, O., Kirkness, E. F., Baysac, K. C., Mosher, D. S., Aguirre, G. D., Acland, G. M. & Ostrander, E. A. (2007) Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Res*, 17, 1562-71.
- Parker, H. G. & Ostrander, E. A. (2005) Canine genomics and genetics: running with the pack. *PLoS Genet*, 1, e58.
- Pribanova, M., Horak, P., Schroffelova, D., Urban, T., Bechynova, R. & Musilova, L. (2009) Analysis of genetic variability in the Czech Dachshund population using microsatellite markers. *J Anim Breed Genet*, 126, 311-8.
- Pritchard, J. K., Wena, X. & Falush, D. (2010) structure software: Version 2.3. Chicago, Department of Human Genetics University of Chicago

- Raymond M., R. F. G. V. (1995) population genetics software for exact tests and ecumenism. . J. Hered, 86.
- Sargan, D. R. (2004) IDID: inherited diseases in dogs: web-based information for canine inherited disease genetics. Mamm Genome, 15, 503-6.
- Takezaki, N., Nei, M. & Tamura, K. (2009) POPTREE2: (computer program) Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows interface. Mol Biol Evol, 27, 747-52,.
- Tarangano de Azar Rosa. El Gran Danés. (1996) Editorial Abatros SACI. Republica de Argentina Bueno Aires. (ISBN: 950240145X)
- Wayne, R. K. & Ostrander, E. A. (2004) Out of the dog house: the emergence of the canine genome. Heredity, 92, 273-4.
- Zangerl, B., Lindauer, S. J., Acland, G. M. & Aguirre, G. D. (2010) Identification of genetic variation and haplotype structure of the canine ABCA4 gene for retinal disease association studies. Mol Genet Genomics, 284, 243-50.