



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL  
TERRIER CHILENO MEDIANTE EL USO DE MICROSATÉLITES**

**PAOLA MUJICA BRANCOLI**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

**PROFESOR GUÍA: VÍCTOR MARTÍNEZ MONCADA**

**SANTIAGO, CHILE**  
2011



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
 ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL  
 TERRIER CHILENO MEDIANTE EL USO DE MICROSATÉLITES

**PAOLA MUJICA BRANCOLI**

Memoria para optar al Título  
 Profesional de Médico Veterinario  
 Departamento de Fomento De la  
 Producción Animal

NOTA FINAL: .....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: VÍCTOR MARTÍNEZ MONCADA	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO:	MÓNICA DE LOS REYES SOLOVERA	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO:	EDUARDO KESSI CAMPOS	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
 2011

**Determinación de la variabilidad genética en el Terrier Chileno  
mediante el uso de microsatélites  
(Determination of genetic variability in the Chilean Terrier using  
microsatellites)**

Paola Mujica Brancoli

Laboratorio FAVET- INBIOGEN, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias,  
Universidad de Chile.

Auspiciado por el Club Nacional del Terrier Chileno y patrocinado por el Laboratorio de  
Investigaciones en Biotecnología y Genómica Animal (FAVET-INBIOGEN)

## RESUMEN

El Terrier Chileno es una nueva raza de perros que recientemente ha sido reconocida por el Kennel Club Chile como la primera raza originada en Chile. En la actualidad hay más de cinco generaciones registradas en el pedigrí, pero no existe información sobre la estructura genética de la raza. En el presente trabajo se investigó la variabilidad genética y se estimaron los niveles de endogamia de esta nueva población. Adicionalmente, el objetivo fue validar un conjunto de marcadores del tipo microsatélites para análisis de paternidad. El ADN se obtuvo de cincuenta fundadores de la raza no emparentados, elegidos de acuerdo a datos de pedigrí. Diecisiete microsatélites fueron genotipados y todos resultaron ser altamente polimórficos, con un número de alelos que osciló entre 4 y 14. El coeficiente de endogamia estimado para cada marcador varió de -0,02 a 0,52. Nueve microsatélites mostraron desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg, probablemente causada por deficiencia de heterocigosidad. Se sugiere que este fenómeno podría ser consecuencia de un aislamiento poblacional ocurrido durante el desarrollo de la raza, pero se requiere mayor investigación al respecto para confirmar esta hipótesis. La probabilidad de exclusión combinada para todos los marcadores fue 0,9999. La información generada en este trabajo representa una herramienta importante que puede ser usada para conducir mejoras en la crianza del Terrier Chileno durante los próximos años y contribuirá con el proyecto que busca que la Federación Cinológica Internacional reconozca al Terrier Chileno como una raza canina oficial.

**Palabras clave:** microsatélites caninos, Terrier Chileno, variabilidad genética.

## ABSTRACT

The Chilean Terrier is a new dog breed which has been recently recognized by the Kennel Club Chile as the first breed originated in Chile. At present there are more than five generations registered in the pedigree but no information exists about the genetic structure within this breed. In the present work we investigated genetic variability and estimated the levels of inbreeding of this new population. In addition, the objective was to validate a set of microsatellite markers for paternity analysis. DNA was isolated from fifty unrelated founders chosen according to pedigree data. Seventeen canine microsatellite markers were genotyped and all of them resulted to be highly polymorphic, with an allele number ranging from 4 to 14. The coefficient of inbreeding estimated for each marker varied from -0.02 to 0.52.

Nine microsatellites showed significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium probably due to heterozygosity deficiency. We suggested that this phenomenon could be a consequence of population isolation occurred during the breed development, but more investigation is needed to confirm this hypothesis. Combined exclusion probability calculated for all markers was 0.9999. The information generated in this work represents an important tool that can be used to conduct breeding management in the Chilean Terrier during the next years and also will contribute to the project that attempts to achieve the recognition as an official breed, given by the International Cinologic Federation.

**Keywords:** canine microsatellites, Chilean Terrier, genetic variability.

## INTRODUCCIÓN

Existen alrededor de 340 razas caninas inscritas en la Federación Cinológica Internacional (FCI), que es el organismo encargado de fomentar y velar por el correcto desarrollo de los perros de raza pura en el mundo [7]. Chile es uno de los países miembros de la FCI y a nivel nacional el organismo representante de dicha institución es el Kennel Club Chile. En nuestro país se han difundido numerosas razas de perros, sin embargo todas ellas corresponden a poblaciones originadas en otros lugares del mundo, las cuales se han importado y desarrollado en nuestro territorio. Sin embargo, recientemente un grupo de criadores caracterizó una nueva raza de perros que podría convertirse en la primera raza canina que nace en Chile.

En teoría, el Terrier Chileno se originó en el país a fines del la época colonial (comienzos del siglo IX) probablemente producto de la mezcla de perros de razas europeas (Fox Terrier Inglés de pelo liso principalmente) con perros mestizos derivados de distintas razas. Producto de estos cruzamientos la raza se hizo bastante rústica, motivo por el cual sus ejemplares se hicieron muy populares. Históricamente se les ha confundido con otros Terriers e incluso son reconocidos por las personas como un perro mestizo.

El proyecto de reconocer al Terrier Chileno como raza oficial comenzó en el año 2007 con la fundación del Club Nacional del Terrier Chileno (CNTC-Chile). Inicialmente se redactó el estándar de la raza lo que permitió iniciar el registro de perros que cumplen con las características deseables para la raza.

El Terrier Chileno se define como un animal valiente, dócil y enérgico. De pelo corto y apretado, destacando la simetría de sus colores y marcas. El cuerpo debe ser predominantemente blanco, excepto en la cabeza y orejas donde debe presentar alguna de las cinco coloraciones aceptadas para la raza: negra, fuego, negra y fuego, marrón y fuego ó azul y fuego (Figura 1). La alzada a la cruz debe oscilar entre 32 a 38 cm. en los machos y 28 a 35 cm en las hembras, con pesos que varían entre 5 y 8 kilos según el sexo [20].

Actualmente se encuentran inscritos en un registro inicial de la raza Terrier Chileno (R.P.I.T.C.), aproximadamente 800 ejemplares y el pedigrí completo consta de cinco generaciones. No obstante, no existe información sobre la estructura y variabilidad genética presente en esta nueva población.

Mediante la implementación de herramientas moleculares, muchas razas caninas han sido estudiadas con el objetivo de establecer parámetros que permitan caracterizar genéticamente a las distintas poblaciones [19, 21, 25]. Utilizando información de marcadores moleculares del tipo microsatélites, estos estudios han obtenido datos que demuestran que no es probable predecir la distribución de los alelos de un locus en distintas poblaciones. Por lo tanto es necesario generar esta información, por ejemplo, para poder definir un conjunto de marcadores moleculares que permitan maximizar la probabilidad de realizar estudios de exclusión de paternidad en una raza.

El objetivo de este trabajo fue utilizar microsatélites previamente descritos para caninos, con el fin de determinar la variabilidad genética presente dentro de esta raza a partir de parámetros genéticos poblacionales. Además, poder establecer un conjunto de marcadores moleculares que permitan maximizar la probabilidad de exclusión en análisis de paternidad, lo que permitirá corroborar información de pedigrí.

Es importante mencionar que, en Chile, no se ha estimado con marcadores moleculares la variabilidad genética en caninos, por lo tanto este trabajo constituye el primer estudio relacionado con la implementación y uso de microsatélites en esta especie para los fines ya mencionados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.- Individuos y toma de muestra**

Utilizando la información de pedigrí de los registros del CNTC-Chile se seleccionaron cincuenta perros de raza Terrier Chileno. Estos ejemplares no se encontraban emparentados y además fueron considerados en el estudio ya que correspondían a los fundadores de la raza según los registros de pedigrí. Las muestras de ADN fueron obtenidas a partir de células de la mucosa bucal de cada uno de los individuos. La extracción de este material se realizó mediante raspado con cepillos citológicos estériles.

### **2.- Genotipado de marcadores**

La extracción de ADN genómico se realizó mediante un kit comercial DNAeasy Blood and Tissue (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de las muestras de células bucales.

La cuantificación del ADN obtenido se llevo a cabo mediante fluorometría, utilizando el sistema Qubit™ (INVITROGEN). Este método se basa en la detección de la fluorescencia emitida por colorantes o fluoróforos selectivos que se unen en forma específica a su molécula objetivo (ADN, ARN o proteínas).

La primera etapa del genotipado de microsatélites implicó la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite amplificar una determinada región de ADN mediante la utilización de partidores oligonucleótidos específicos [23]. La segunda fase del genotipado involucró la detección del tamaño de los amplicones mediante electroforesis capilar. La ventaja de este método radica en que logra separar por tamaño las regiones del ADN amplificado a través de un capilar, y detectarlo automáticamente por fluorescencia ya que el PCR se realizó utilizando uno de los partidores marcado con un fluoróforo específico, pudiéndose diferenciar fragmentos que tienen sólo una base de diferencia.

En este trabajo, un total de diecisiete microsatélites descritos para caninos fueron genotipados. Siete de ellos se seleccionaron de la literatura [8, 12] y los restantes diez se obtuvieron a partir de un kit comercial para determinación de paternidad en caninos (Stockmarks® for Dogs Canine Genotyping Kit. Applied Biosystems, UK).

Con el fin de realizar posteriores comparaciones entre ambos grupos de marcadores, se designó como Grupo 1 a los marcadores obtenidos de la literatura y como Grupo 2 a los provenientes del kit comercial.

Las amplificaciones de los microsatélites del Grupo 1 se llevaron a cabo en reacciones de PCR individuales. Las referencias de cada uno de ellos y los partidores *sentido* y *antisentido* utilizados para su amplificación se encuentran descritos en la Tabla 1.

Con el objetivo de obtener amplicones fluoroforados, para cada reacción de PCR se incluyó en la mezcla un tercer partidor, M13, marcado con uno de los siguientes fluoróforos: FAM, VIC, NED o PET. Este partidor tiene como función unirse a una secuencia complementaria (denominada *cola de M13*) que está contenida en el extremo 5' de cada partidor *sentido*, permitiendo reducir los costos de marcar con fluorescencia cada uno de los partidores seleccionados. Para llevar a cabo esta técnica se ajustaron las condiciones de amplificación del PCR de acuerdo a las recomendaciones del autor [29].

La mezcla para la reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 10  $\mu$ l, conteniendo 1X de tampón de PCR; 3 mM de  $MgCl_2$ ; 0,75 U Taq polimerasa (Fermentas), 83  $\mu$ M de mezcla de dNTPs, 340  $\mu$ M de partidor *sentido*, 850  $\mu$ M de partidor *antisentido*, 850  $\mu$ M de partidor M13 fluoroforado y 10-20 ng de ADN. Se utilizó un termociclador Axygen con gradiente y las condiciones de amplificación se optimizaron para cada juego de partidores, de forma tal de asegurar un producto fluoroforado específico y detectable por electroforesis capilar.

El *Stockmarks® for Dogs Canine Genotyping Kit* (Applied Biosystems, UK) incluye diez marcadores para ser amplificados en forma de multiplex, por lo tanto se obtuvo amplificación de cada uno de los diez loci en una misma reacción de PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de PCR fueron enviados a un servicio comercial externo que utiliza un secuenciador automático ABI PRISM® 3730xl Analyzer (Applied Biosystem) para el análisis mediante electroforesis capilar, informando los resultados mediante electroferogramas donde se visualizan los alelos por su fluorescencia.

El genotipado, que consiste en la determinación exacta de los tamaños de los alelos en cada locus, se llevó a cabo mediante el programa Genemapper® Software 3.2 (Applied Biosystems).

En la Figura 2 se pueden apreciar dos electroferogramas generados a partir de los datos obtenidos de la electroforesis capilar de dos de las muestras analizadas.

### 3.- Análisis de los datos.

A partir de los genotipos, se calculó la frecuencia y número de alelos para cada locus, heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y valores de PIC “polymorphic information content”. La siguiente ecuación permite obtener los valores de PIC [3].

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Donde  $p_i$  corresponden a la frecuencia del alelo  $i$  en la población, y  $n$  es el número de alelos existentes en el marcador molecular. Estos parámetros son válidos para todas las ecuaciones utilizadas en este trabajo

Los estimadores descritos fueron obtenidos mediante el programa Cervus 3.0 [18]. A través de este programa, se calcularon también las probabilidades de exclusión para cada locus (PE) según Jamieson 1965, donde se busca excluir un padre considerando información del genotipo del descendiente y de ambos padres. La ecuación es la siguiente:

$$PE = 1 - 2 \sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i=1}^n p_i^3 + 2 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 2 \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 3 \sum_{i=1}^n p_i^2 \sum_{i=1}^n p_i^3$$

Con el objetivo de establecer la posibilidad de realizar eficazmente pruebas de paternidad mediante los microsatélites analizados en la población, se calculó la probabilidad de exclusión combinada (PEC) para un conjunto de loci, de acuerdo a la ecuación propuesta por Jamieson y Taylor 1997:

$$PEC = 1 - (1 - PE_1)(1 - PE_2)(1 - PE_3) \dots (1 - PE_k)$$

Donde  $k$  es el número de loci analizados para alcanzar un determinado valor de PEC.

De manera de poder comparar los resultados obtenidos para los siete marcadores seleccionados de la literatura (Grupo 1) versus los diez marcadores genotipados a partir del kit (Grupo 2), se calculó el PEC para ambos grupos de marcadores por separado y también en conjunto.

Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg se evaluaron utilizando tests exactos mediante el método de cadena de Markov [9]. Estos datos fueron calculados con el programa GENEPOP version 4.0 disponible en la web [27, 28]. Para estimar el déficit o exceso de heterocigotos, se calculó para cada marcador el coeficiente de endogamia  $F_{is} = H_e - H_o / H_e$ .

## RESULTADOS

En la Tabla 2 se encuentran detalladas las frecuencias alélicas observadas en la población para cada uno de los 17 marcadores. El detalle de los resultados correspondientes al número de alelos, heterocigocidad observada y esperada, valores de PIC, coeficiente de endogamia y valor de  $P$  estimado para determinar equilibrio Hardy-Weinberg, se muestran en la Tabla 3.

El número de alelos encontrados varió en los distintos loci, entre 4 (FH2010) y 14 (FH2132), resultando en un promedio de 8,35 alelos por locus. La heterocigosidad observada osciló entre 0,33 y 0,87, mientras que la heterocigosidad esperada mostró valores límites menos distantes, entre 0,68 y 0,90. En general, las cifras estimadas de PIC para cada locus fueron relativamente altas, alcanzando un promedio de 0,77. Estos resultados demuestran que existe un alto nivel de polimorfismo en la población para los marcadores analizados.

Nueve loci presentaron desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg (valor  $P < 0,05$ ). Los valores de  $F_{is}$  estimados en cada marcador variaron ampliamente entre los 17 loci, siendo FH2201 el que obtuvo el valor más bajo (-0,04) y FH2079 el que mostró el mayor valor, alcanzado un coeficiente de endogamia de 0,52.

En la Tabla 3 se puede apreciar que los loci FH2132, FH2079, PEZ1, PEZ12 y PEZ3 no satisfacen el equilibrio de Hardy-Weinberg y presentan valores de  $F_{is}$  mayores a 0,25. Esta situación es compatible con la idea de que la ausencia de equilibrio Hardy-Weinberg, es reflejo de un déficit en el número de heterocigotos en la mayoría de los loci involucrados.

El detalle de la probabilidad de exclusión individual obtenida para cada uno de los 17 marcadores se encuentra en la Tabla 4. La probabilidad de exclusión combinada (PEC) calculada para los marcadores de los Grupos 1 y 2 fueron 0,9951 y 0,9939, respectivamente. Considerando los 17 loci incluidos en ambos grupos, el cálculo de PEC alcanzó un valor de 0,9999, lo que indica *a priori* que es posible realizar pruebas de paternidad en la población utilizando estos marcadores.

## **DISCUSIÓN**

Las razas caninas históricamente han estado sometidas a una intensa selección por parte de los criadores, debido al creciente interés por alcanzar la perfección de acuerdo al estándar de cada raza. Este proceso es especialmente intenso cuando una raza se encuentra en etapa de desarrollo inicial, donde existen pocos ejemplares que cumplen el estándar y a partir de ellos se busca expandir la población, potenciando determinadas características de interés. Este es el caso del Terrier Chileno, por lo tanto los resultados obtenidos en este proyecto permiten establecer la variabilidad genética con la cual se está estructurando la población.

La información analizada a partir de los datos calculados en este estudio, demuestra que el nivel de variabilidad genética presente en la raza Terrier Chileno es alta si se le compara con datos publicados en estudios similares, en los cuales se han analizados otras razas caninas.

DeNise *et al.* (2004) [4] estudió la variabilidad genética de 9561 ejemplares de 108 razas registrados en el American Kennel Club. Para esto, los autores seleccionaron 17 marcadores, 10 de los cuales fueron obtenidos del mismo kit comercial de StockMarks® utilizado en nuestro estudio. Gracias a esta similitud en el número y tipo de marcadores, podemos establecer comparaciones más certeras en cuanto a los resultados de ambos trabajos. En el Terrier Chileno todos los marcadores analizados resultaron ser muy polimórficos, sin embargo, en el estudio de DeNise hubo cuatro marcadores (FH2079, FH2010, PEZ20, PEZ5) que exhibieron sólo un alelo en algunas razas, tales como Bóxer, Bull Terrier, Skye Terrier y Pharaoh Hound.

Si bien este monomorfismo puede atribuirse al bajo número de animales muestreados, nos permite establecer que estos marcadores no son lo suficientemente informativos en todas las razas, pero sí para el Terrier Chileno, donde el menor número de alelos fue cuatro (marcador FH2010).

Asimismo, la comparación de ambos estudios demuestra que el valor de 8,4 alelos por locus estimado en el Terrier Chileno fue igual al valor más alto obtenido para este estimador dentro del total de razas, que correspondió al Pastor Australiano [4]. Este análisis demuestra que la población de Terrier Chileno estudiada posee un alto grado de diversidad genética.

La heterocigosidad o heterocigosis es un parámetro que mide la frecuencia de individuos heterocigotos en cada locus y puede expresarse como un valor observado, y también, como un valor esperado calculado según las frecuencias génicas presentes en la población. Calcular la heterocigosidad para cada locus permite obtener el valor promedio para todos los loci, el cual indica la proporción de loci para los cuales se espera que el individuo sea heterocigoto [6]. La heterocigosidad observada promedio en la población de Terrier Chileno analizada fue de 0,69, lo que quiere decir que se espera que un individuo promedio de la población sea heterocigoto en un 69% de sus loci. Este valor se encuentra dentro del rango de datos publicados para otras razas de terriers donde las heterocigosidades alcanzaron valores de 0,39 en la raza Bull Terrier, 0,52 en los Airedale Terrier y 0,79 en los Jack Russell Terrier [13].

El parámetro *polymorphic information content* (PIC) promedio calculado para todos los marcadores analizados fue de 0,77. Dada la información disponible en la literatura, este valor se considera alto ( $PIC > 0,5$ ) [3] y excede a los valores de PIC promedio publicados para otras poblaciones de perros de raza pura [4]. En estudios que consideran individuos de distintas razas es esperable encontrar valores de PIC bastante más altos que los obtenidos para una sola raza. Sin embargo, el PIC calculado en este estudio es semejante al que se ha descrito para un conjunto de individuos no emparentados provenientes de 24 razas distintas [1], por lo que se confirma la alta variabilidad genética pesquisada en la población analizada.

Mediante la prueba de Hardy-Weinberg es posible establecer si una población se encuentra en equilibrio genético, es decir, si las frecuencias génicas y genotípicas del grupo de individuos permanecen constantes de generación en generación, asumiendo que la población cumple con los siguientes supuestos: presencia de apareamiento aleatorio y ausencia de mutación, migración, selección y herencia mendeliana [6]. Los resultados de este trabajo demostraron que 9 de los 17 loci presentan desviaciones significativas ( $P < 0,05$ ) en relación a lo esperado bajo equilibrio Hardy-Weinberg. Considerando los valores de los coeficientes de endogamia podemos establecer que los desvíos, en la mayoría de los loci, se explican principalmente por un aumento de los homocigotos, y, como es de esperar, los cinco marcadores que presentan los valores más altos para este parámetro ( $F_{is} > 0,25$ ) no cumplen con el supuesto de equilibrio según Hardy-Weinberg. .

Un fenómeno que eventualmente puede hacer que se evidencie un exceso de homocigotos en estudios poblacionales es la presencia de alelos nulos. Los alelos nulos se producen cuando existe una mutación en uno de los sitios de unión de los partidores, lo que genera que un alelo no amplifique. Existen dos opciones para corroborar la presencia de un alelo nulo.

La primera técnica consiste en llevar a cabo pruebas con distintos partidores modificados en el supuesto sitio de mutación, y la segunda se basa en genotipar familias en las cuales esté establecida con certeza la paternidad, de manera de poder comparar los genotipos de padres e hijos, y así identificar la ausencia de un determinado alelo en aquellos casos donde exista incompatibilidad, asumiendo que las familias están correctamente asignadas [26]. No se ha comprobado que los marcadores seleccionados de la literatura para este estudio hayan generado alelos nulos en otras poblaciones caninas y el kit StockMarks® utilizado se encuentra optimizado para minimizar este efecto [11]. Por lo tanto es esperable que la técnica de amplificación, utilizando estos marcadores, no genere alelos nulos en individuos de la misma especie, ya que ha sido ampliamente probada. Sin embargo, no es posible descartar que en la población analizada existan mutaciones que podrían haber producido la no amplificación de algunos alelos.

No obstante, es poco probable que el aumento de homocigotos en más de la mitad de los loci se deba exclusivamente a la presencia de alelos nulos. Los datos obtenidos en este trabajo describen que, a pesar del aumento en el número de homocigotos detectado en la población (valores de  $F_{is}$  positivos en la mayoría de los loci), existe una alta diversidad genética entre los individuos. Este fenómeno ha sido descrito previamente en poblaciones de perros de raza pura [2,17], y se ha postulado que no sólo la selección fenotípica puede incrementar los niveles de endogamia, sino que también este aumento puede producirse debido a aislamiento territorial de grupos de individuos, el cual genera subpoblaciones distintas dentro de una misma raza. Estas poblaciones subdivididas exhiben un aumento de homocigotos, lo que genera un proceso de estructuración geográfica en la población que se conoce como efecto Wahlund [30]. Esta situación se ha documentado en poblaciones de perros domésticos. Un estudio realizado en Corea, donde se tomaron muestras de perros de una misma raza localizados en distintos lugares geográficos, comprobó que existían grupos que constituían subpoblaciones diferenciadas genéticamente, cuyas frecuencias genotípicas, al ser considerada como una sola población, no correspondían a las frecuencias esperadas para el equilibrio Hardy-Weinberg debido a un déficit en el número de heterocigotos [16].

Este proceso de subdivisión de la población es compatible con la historia del desarrollo de la raza nacional. Desde sus inicios el Terrier Chileno fue considerado un perro rústico y fácil de manejar, lo cual motivó su distribución por todo el territorio nacional, principalmente en fundos y terrenos rurales [22]. Al ser una raza no reconocida, estuvo exenta de manejo reproductivo, por lo que el bajo intercambio de ejemplares entre distintas zonas generó que los grupos de perros se vieran sometidos a aislamiento reproductivo, lo que podría explicar un mayor grado de homocigosis en cada una de las subpoblaciones (efecto Wahlund). De esta forma los grupos podrían haberse hecho cada vez más genéticamente parecidos entre sí, y a su vez, esto provocaría que se fueran diferenciando de otras jaurías que se desarrollaron de igual manera en otros territorios distantes, con los cuales no existió intercambio genético. Por lo tanto los resultados de este trabajo estarían demostrando que la alta variabilidad genética estimada en la población estudiada se debe al muestreo de individuos provenientes de distintos lugares del país, los cuales podrían ser parte de subpoblaciones distintas, explicándose así el aumento de homocigotos detectado en la población total.

Para poder probar si existió un fenómeno de estructuración geográfica en la raza, que podría ser la causa del desequilibrio pesquisado en este trabajo, sería necesario realizar otro estudio en el cual se incluya un número mayor de ejemplares que provengan de distintas zonas geográficas previamente definidas. De esta manera sería posible establecer si existen diferencias significativas entre las distintas subpoblaciones de manera de corroborar esta teoría.

Para llevar a cabo con éxito pruebas de paternidad en perros, la literatura recomienda valores de probabilidad de exclusión combinada (PEC) mayores a 0,9995 [10]. En este estudio, la probabilidad de exclusión combinada para los 17 loci alcanzó un valor máximo de 0,9999, por lo que se confirma la utilidad de este conjunto de marcadores para resolver estudios de paternidad en el Terrier Chileno.

Las PEC calculadas para el Grupo 1 y el Grupo 2, a pesar de ser bastantes altas no superan el valor recomendado ( $PEC > 0,9995$ ), por lo que ambos grupos de marcadores por si solos no serían tan eficientes a la hora de implementar ensayos de este tipo en la población (Tabla 4). Cabe destacar que el Grupo 1 alcanzó un PEC levemente mayor al Grupo 2, a pesar de incluir un menor número de marcadores (7 versus 10 del Grupo 2).

Esta situación podría deberse a que el 43% de los loci que componen el Grupo 1 se encuentran incluidos en el panel de paternidad de la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) definido el año 2005, lo que respalda el potencial que tienen estos marcadores para pruebas de paternidad, ya que han sido ampliamente probados a nivel internacional en distintas razas caninas.

Sólo el 0,1 % de los loci perteneciente al Grupo 2 se encuentran descritos en el panel de ISAG, sin embargo estos marcadores, pertenecientes al *Stockmarks® for Dogs Canine Genotyping Kit*, también han demostrado ser útiles para realizar este tipo de análisis en perros en Estados Unidos [4].

Finalmente, es importante mencionar que recientemente se ha descrito que uno de los marcadores utilizados en este estudio, FH2201, presenta una alta tasa de mutación en la especie (2,35%) y ha causado errores al ser utilizado en pruebas de paternidad [24]. Por esta razón, se decidió calcular la probabilidad de exclusión combinada excluyendo al locus FH2201 y resultó que analizando 16 loci se logra alcanzar un valor de PEC de 0,9999, por lo que sería recomendable no considerar al marcador FH2201 para futuras pruebas con el fin de evitar errores en la asignación o exclusión de paternidad.

## **CONCLUSIONES**

La variabilidad genética presente en la población de ejemplares fundadores de raza Terrier Chileno es lo suficientemente alta cuando es medida a nivel nacional, por lo tanto existe el potencial genético para llevar a cabo cruzamientos que favorezcan características deseables para la raza, sin arriesgar los niveles de diversidad de la población.

Sin embargo, es importante considerar que existe ausencia de equilibrio genético en algunos loci, explicada por una disminución de heterocigotos, por consiguiente, es necesario monitorear los niveles de consanguinidad para manejar esta variable. Se postula que este déficit de heterocigotos podría deberse a un fenómeno de estructuración geográfica de la población, pero es necesario realizar otros estudios que incluyan un número mayor de ejemplares, localizados en distintas zonas, para confirmar esta teoría.

La probabilidad de exclusión combinada para los 17 microsatélites analizados demuestra que este conjunto de marcadores contiene la información suficiente para ser utilizado con éxito en pruebas de paternidad canina en la raza e incluso podría no considerarse el locus FH2201, debido a su alta tasa de mutación, y aún así el grupo de 16 loci alcanza una probabilidad de exclusión adecuada para realizar este tipo de pruebas. Esta herramienta permitirá verificar la integridad de los registros iniciales de pedigrí del Terrier Chileno con el fin de confirmar su validez como nueva raza a nivel internacional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer todo el apoyo brindado por el equipo de personas del Laboratorio de Investigaciones en Biotecnología y Genómica Animal FAVET-INBIOGEN. En especial me gustaría mencionar al Dr. Víctor Martínez, quien dirigió este trabajo y confió en mí para su realización, y a Ana Jedlicki, encargada del laboratorio, por su constante consejo y motivación tanto en el área profesional como personal.

La obtención de muestras para este trabajo no hubiera podido llevarse a cabo sin la colaboración del Club Nacional del Terrier Chileno. Mis más sinceros agradecimientos a su presidente, Sr. César Maerten y a cada uno de los criadores y propietarios por su confianza, interés y buena disposición para facilitar el muestreo de sus perros.

Por último, pero no menos importante, quisiera manifestar el incondicional apoyo que he recibido siempre de mi familia. Su incentivo y persistente preocupación por mi formación profesional me llevan hoy a finalizar esta etapa con la presentación de mi trabajo de tesis.

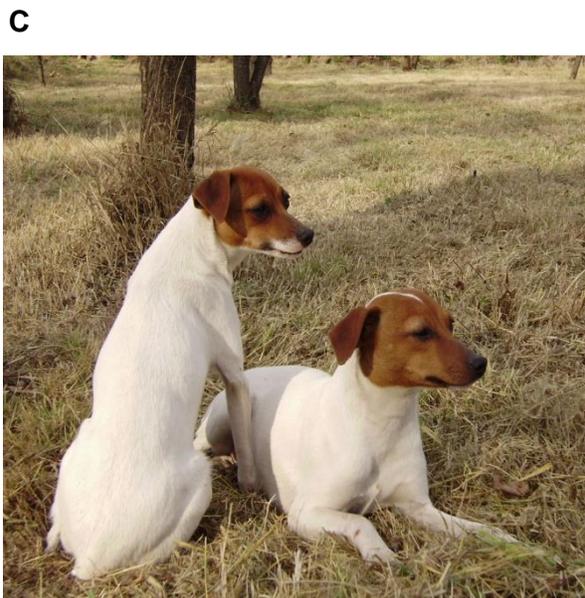
## REFERENCIAS

1. ALTET, L; FRANCINO, O; SÁNCHEZ, A. 2001. Microsatellite Polymorphism in Closely Related Dogs (Brief communication). *J. Hered.* 92(3): 276-279.
2. ALTUNOK, V; KOBAN, E; CHIKHI, L; SCHAFFER, A; PEDERSEN, N; NİZAMLIOĞLU, M; TOGAN, I. 2005. Genetic evidence for the distinctness of Kangal dogs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 49: 249-254.
3. BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
4. DENISE, S.; JOHNSTON, E; HALVERSON, J; MARSHALL, K; ROSENFELD, D; MCKENNA, S; SHARP, T; EDWARDS, J. 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: 14-17.
5. EICHMANN, C; BERGER, B.; PARSON, W. 2004. A proposed nomenclature for 15 canine-specific polymorphic STR loci for forensic purposes. *Int. J. Legal Med.* 118: 249-266.
6. FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*, 4<sup>th</sup> ed. Longman, Harrow, Essex, UK.
7. FÉDÉRATION CYNOLOGIQUE INTERNATIONALE. Declaración de Misión, visión y valores de la FCI. [en línea] < [www.fci.be](http://www.fci.be) > [consulta: 20-04-2009]
8. FRANCISCO, L.V.; LANGSTON, A. A.; MELLERSH, C. S.; NEAL, C. L.; OSTRANDER, E. A. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mamm. Genome.* 7: 359-362.
9. GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 48: 361-372.
10. HALVERSON, J. L.; EDWARDS, J. W. 2000. Microsatellite polymorphism in dog breeds- the AKC parent club study.

11. HALVERSON, J; BASTEN, C. 2005. A PCR Multiplex and Database for Forensic DNA Identification of Dogs. *J Forensic Sci.* 50(2): 1-12.
12. INTERNATIONAL SOCIETY OF ANIMAL GENETICS. 2005. Canine Panel for parentage verification. [en línea] <<http://www.isag.org.uk/ISAG/all/2005ISAGPanelDOG.pdf>> [consulta: 30-03-2009]
13. 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: 81-87.
14. JAMIESON, A.1965. The genetics of transferring in cattle. *Heredity.* 20: 419-444
15. JAMIESON, A.; TAYLOR, ST. C. S. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim. Genet.* 28(6): 397-400.
16. KANG BT., KIM KS.; MIN MS. 2009. Microsatellite loci analysis for the genetic variability and the parentage test of five dog breeds in South Korea. *Genes Genet. Syst.* 84: 245-251.
17. KANTHASWAMY, S. 2009. Development and validation of a standardized canine STR panel for use in forensic casework. Final report for NIJ Grant 2004-DN-BX-K007. [en línea] <<http://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/226639.pdf>.> [consulta: 04-03-2011]
18. KALINOWSKI, S.; TAPER, M.; MARSHALL, T. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: 1099-1006.
19. KOSKINEN MT.; BREDBACKA P. 2000. Assesment of the population structure of five Finnish dog breeds with microsatellites. *Anim. Genet.* 31: 310-317.
20. MAERTEN, C. 2007. Estándar del Terrier Chileno (Fox Terrier Chileno o Ratonero Chileno). [en línea] < <http://www.terrierchileno.cl/estandar.html>> [consulta: 07-06-2009].
21. MORERA, L.; DE ANDRÉS, D.F.; BARBANCHO, M.; GARRIDO, J.J.; BARBA, C.J. 1999. Detección de variabilidad genética por microsatélites en el Alano Español. *Arch. Zootec.* 48(181): 63-70.
22. MUJICA, P; MARTÍNEZ, V; MAERTEN, C. 2009. El Terrier Chileno. *Revista Tecnovet.* 3: 10-13.

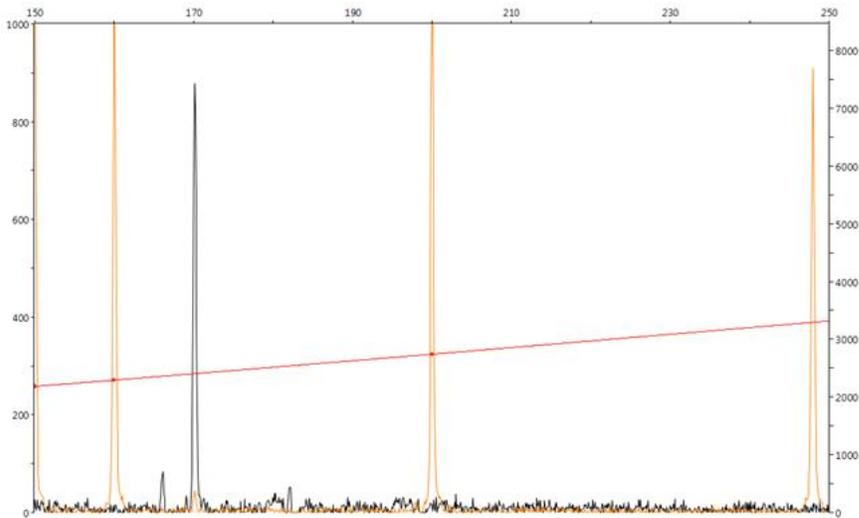
23. MULLIS, K; FALOONA, F; SCHARF, S; SAIKI, R; HORN, G; ERLICH, H. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.
24. PARRA, D.; GARCÍA, D.; MÉNDEZ, S.; CAÑÓN, J.; Dunner, S. 2010. High mutation rates in canine tetranucleotide microsatellites: Too much risk for genetic compatibility purposes?. The Open Forensic Science Journal. 3: 9-13.
25. PARRA, D.; MÉNDEZ, J.; CAÑÓN, J.; DUNNER, S. 2008. Genetic differentiation in pointing dog breeds inferred from microsatellites and mitochondrial DNA sequence. Anim. Genet. 39: 1-7.
26. PEMBERTON, J.; SLATE, J.; BANCROFT, D.; BARRTE, J. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite *loci*: a caution for parentage and population studies. Mol. Ecol. 4: 249-252.
27. RAYMOND, M.; ROUSSET, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Hered. 86: 248-249.
28. ROUSSET, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. Mol. Ecol. Resour. 8: 103-106.
29. SCHUELKE, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nat. Biotechnol. 18: 233-234.
30. WAHLUND, S. 1928. Zusammensetzung von population und korrelationserscheinung vom stand-punkt der vererbungslehre aus betrachtet. Hereditas. 11: 65-106.

## ANEXOS

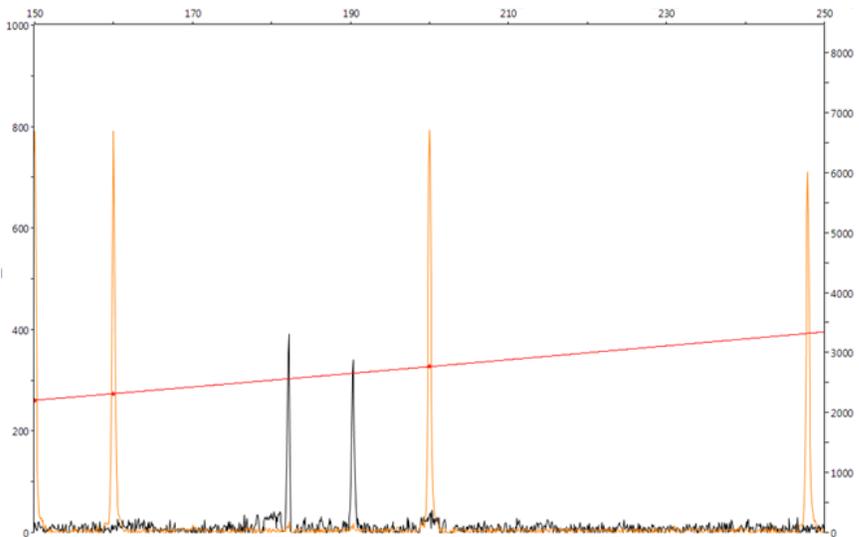


**Figura 1.** Ejemplares que representan tres de las cinco coloraciones de manto aceptadas en la raza Terrier Chileno. **A.** ejemplar tricolor blanco/negro/fuego. **B.** ejemplar tricolor blanco/marrón/fuego y **C.** ejemplares bicolors blanco/fuego.

**A**



**B**



**Figura 2.** Electroferogramas de microsatélites analizadas mediante electroforesis capilar. Los picos color negro que se observan corresponden a los amplicones marcados con el fluoróforo NED y los picos amarillos corresponden a los estándares. El tamaño de cada amplicón está determinado en pares de bases (pb) según se indica en el eje x. El eje y, o altura del pico, corresponde a la intensidad de fluorescencia detectada en el amplicón. **A.** Individuo homocigoto. Se observa un pico único, cuyo tamaño es de 170 pb. **B.** Individuo heterocigoto. Se observan dos picos de semejante altura, a los cuales se les asignaron tamaños de 182 y 190 pb. Los tamaños exactos de cada amplicón son entregados por el programa Genemapper® Software 3.2.

**Tabla 1.** Secuencias de los partidores *sentido* y *antisentido* correspondientes a cada uno de los marcadores seleccionados de la literatura y que corresponden al Grupo 1.

<b>Marcador</b>	<b>secuencia partidior <i>sentido</i></b>	<b>secuencia partidior <i>antisentido</i></b>	<b>referencia</b>
AHTh171	5' AGGTGCAGAGCACTCACTCA 3'	5' CCCATCCACAGTTCAGCTTT 3'	[11]
INRA21	5' ATGTATTGAGATTTCTCCTACG 3'	5' TAATGGCTGATTTATTTGGTGG 3'	[11]
AHT121	5' TATTGCGAATGTCACTGCTT 3'	5' ATAGATACTCTCTCTCCG 3'	[11]
FH2137	5' GCAGTCCCTTATTCCAACATG 3'	5' CCCCAAGTTTTGCATCTGTT 3'	[7]
FH2175	5' TTCATTGATTTCTCCATTGG 3'	5' AGGACTCTAAAACTTGCCTCC 3'	[7]
FH2201	5' ATCAACAATGCATGCCACA 3'	5' GAGAACAATAAATGCAAGCCC 3'	[7]
FH2132	5' CACTGGGAGTGGAGACTG 3'	5' TGCACAGCCAAGTAGAGGTG 3'	[7]

**Tabla 2.** Frecuencias alélicas detectadas en la población de Terrier Chileno para cada uno de los 17 loci analizados. Los alelos para cada locus se designan con números de 1 a 14, de acuerdo a la cantidad de alelos presentes. De izquierda a derecha, se muestran las frecuencias correspondientes a los alelos que se obtuvieron para cada loci.

Locus	Alelos													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>FH2132<sup>a</sup></b>	0,1	0,0667	0,0333	0,0667	0,0667	0,3	0,1	0,0667	0,0333	0,0333	0,0333	0,0333	0,0333	0,0333
<b>AHth171</b>	0,1	0,225	0,75	0,1125	0,1625	0,05	0,05	0,0625	0,0875	0,0626	0,0125			
<b>AHT121</b>	0,0526	0,0526	0,0921	0,0921	0,1447	0,1842	0,1316	0,1053	0,0658	0,0263	0,0526			
<b>FH2137</b>	0,0135	0,0811	0,2027	0,2703	0,1622	0,0135	0,0405	0,1216	0,0405	0,0405	0,0135			
<b>INRA21</b>	0,0441	0,0147	0,1912	0,0294	0,2647	0,2059	0,1029	0,0882	0,0441	0,0147				
<b>PEZ12</b>	0,1429	0,1	0,2143	0,1857	0,0714	0,0571	0,1286	0,0143	0,0714	0,0143				
<b>PEZ3</b>	0,0286	0,0429	0,0143	0,1	0,4571	0,1857	0,0857	0,0429	0,0286	0,0143				
<b>FH2175</b>	0,1522	0,1739	0,1304	0,2826	0,087	0,1087	0,0435	0,0217						
<b>PEZ6</b>	0,0676	0,2297	0,1622	0,0135	0,2838	1,1351	0,0676	0,0405						
<b>FH2054</b>	0,0694	0,1667	0,25	0,1528	0,1667	0,0833	0,1111							
<b>PEZ20</b>	0,0139	0,0139	0,1806	0,25	0,2778	0,2083	0,0556							
<b>PEZ8</b>	0,1111	0,1667	0,3056	0,3056	0,0694	0,0278	0,0139							
<b>PEZ1</b>	0,0469	0,125	0,2344	0,1875	0,25	0,1563								
<b>FH2079</b>	0,1667	0,375	0,375	0,0139	0,0694									
<b>PEZ5</b>	0,0405	0,2973	0,1622	0,2568	0,2432									
<b>FH2010</b>	0,1081	0,3108	0,1351	0,4459										

<sup>a</sup> se ha descrito que el locus FH2132 presenta inserciones que modifican la estructura de repetición en tándem propia de un marcador tetranucleótido, por lo tanto se caracteriza por presentar un alto número de alelos, llegando hasta 44 alelos en una población mixta. [5]

**Tabla 3.** Resultados obtenidos para los 17 loci analizados. Número de alelos (NA), heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), valor de PIC, coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) y valor de  $P$  estimado para determinar equilibrio Hardy-Weinberg.

<b>Locus</b>	<b>NA</b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>	<b>PIC</b>	<b><math>F_{is}</math></b>	<b>Valores <math>P</math></b>
AHT171	11	0,775	0,885	0,862	0,12	0,1964
INRA21	10	0,735	0,84	0,806	0,13	0,0233
AHT121	11	0,816	0,898	0,876	0,09	0,463
FH2137	11	0,865	0,844	0,813	-0,02	0,0079
FH2175	8	0,739	0,846	0,807	0,13	0,0065
FH2201	8	0,808	0,78	0,731	-0,04	0,0168
FH2132	14	0,667	0,894	0,854	0,25	0,0279
FH2010	4	0,649	0,684	0,618	0,05	0,1208
FH2054	7	0,694	0,846	0,813	0,18	0,1312
FH2079	5	0,333	0,696	0,628	0,52	0
PEZ1	6	0,563	0,818	0,776	0,31	0
PEZ12	10	0,657	0,871	0,843	0,25	0
PEZ20	7	0,694	0,792	0,746	0,12	0,1733
PEZ3	10	0,543	0,744	0,707	0,27	0,0088
PEZ5	5	0,784	0,769	0,717	-0,02	0,2629
PEZ6	8	0,703	0,822	0,786	0,14	0,1767
PEZ8	7	0,778	0,778	0,732	0	0,2501
Promedio	8,35	0,694	0,812	0,771	0,15	0,1097

**Tabla 4.** Probabilidad de exclusión calculada para cada locus (PE) y valores de PEC calculados para el conjunto de 7 loci (Grupo 1) y de 10 loci (Grupo2).

<b>Locus</b>	<b>PE</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Locus</b>	<b>PE</b>	<b>Clasificación</b>
AHTh171	0,597	Grupo1	FH2010	0,252	Grupo 2
INRA21	0,49	Grupo1	FH2054	0,497	Grupo 2
AHT121	0,625	Grupo1	FH2079	0,262	Grupo 2
FH2137	0,502	Grupo1	PEZ1	0,433	Grupo 2
FH2175	0,489	Grupo1	PEZ12	0,555	Grupo 2
FH2201	0,381	Grupo1	PEZ20	0,39	Grupo 2
FH2132	0,591	Grupo1	PEZ3	0,356	Grupo 2
Total 7 loci	0,9951 <sup>a</sup>	Grupo1	PEZ5	0,35	Grupo 2
			PEZ6	0,455	Grupo 2
			PEZ8	0,376	Grupo 2
			Total 10 loci	0,9939 <sup>a</sup>	Grupo 2

<sup>a</sup>valores de PEC calculados para cada grupo de loci. La PEC obtenida para el total de 17 loci es 0,9999.