

Estudio de la variabilidad genética en equinos pura sangre de carrera y su incidencia en el diagnóstico de paternidad

Gagliardi, R.¹; Biagetti, R.¹; Kelly, L.¹

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es estimar la variabilidad genética en equinos Pura Sangre de Carrera (PSC) del Uruguay basándose en el Índice de Heterocigosidad medio esperado (I.H.), y en su grado de incidencia en el diagnóstico de paternidad. Se utilizan marcadores genéticos sanguíneos. Se tipifican 100 equinos PSC elegidos al azar, para siete sistemas de grupos sanguíneos y cuatro sistemas de polimorfismos proteicos, siendo el Índice de Heterocigosidad medio esperado de 0,411. Este resultado fue mayor al encontrado en la muestra de EEUU. Se realiza el cálculo de la Probabilidad de Exclusión (PE) para determinar la eficiencia de estos marcadores en el diagnóstico de paternidad, siendo su resultado de 95,528 %. Se concluye que la mayor variabilidad genética presentada por los PSC uruguayo sería causal de una elevada PE.

Palabras Clave: *Marcadores genéticos sanguíneos, Variabilidad genética, Equinos Pura Sangre de Carrera, Probabilidad de exclusión.*

SUMMARY

The objective of the present paper is to determine the genetic variability in Thoroughbred horses from Uruguay through the expected average heterocigosity and the incidence of genetic variability in the paternity tests analyzed by blood markers. A hundred horses chosen by chance are typed for seven blood systems and four protein systems, being the expected average heterocigosity 0,411. This result is higher than those found in United States sample. The Exclusion Probability (EP) obtained in this experience correspond to 95,528 %. It is concluded that the higher genetic variability presented in Thoroughbred would be the cause of this high EP, being an indicator of the paternity test efficiency.

Keywords: *Blood genetic markers, Genetic Variability, Thoroughbred horses, Exclusion Probability*

INTRODUCCIÓN

La conservación de la variabilidad genética en caballos PSC permite diseñar los métodos de selección artificial adecuados para evitar los efectos negativos de la consanguinidad. Para ello, es necesario conocerla. Esta se analiza mediante índices estadísticos que se estiman a partir de marcadores genéticos (grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos). Estos marcadores también se utilizan para realizar diagnóstico de paternidad e identificación individual (2, 6, 11) permitiendo avalar objetivamente la selección por pedigrí en animales de gran valor económico.

El grado de eficiencia de estas aplicaciones depende del polimorfismo de los marcadores genéticos de cada raza equina y de la variabilidad genética de ésta (9, 10).

De acuerdo a los resultados del índice de heterocigosidad obtenidos en diferentes razas equinas de EEUU (2,1,5) y de Francia (6), el PSC presenta uno de los valores más bajos. Una causa de estos datos podría ser el bajo número de individuos fundadores de esta raza, sumándole 200 años de libros genealógicos cerrados (2).

El propósito del presente trabajo es estudiar el perfil genético del PSC uruguayo con el objetivo de evaluar el grado de variabilidad genética mediante el I.H. y su incidencia sobre la eficiencia en el diagnóstico de paternidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 100 muestras sanguíneas de equinos uruguayos Pura Sangre de Carrera, pertenecientes a la

generación parental. Las muestras se obtuvieron de diferentes regiones del país. Se determinaron los grupos sanguíneos por medio de las técnicas de hemólisis y aglutinación (14), empleándose una batería de 27 reactivos chequeados internacionalmente. Los sistemas analizados fueron: A, C, D, K, P, QyU. Los polimorfismos bioquímicos se determinaron por técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) para los siguientes sistemas: albúmina (Al), esterasas (Es), transferrinas (Tf) (8) y la técnica de almidón para el sistema PGD (1).

El estudio de la estructura poblacional se realizó basándose en el cálculo de las frecuencias génicas por los siguientes métodos: conteo de genes (polimorfismos proteicos), método de

¹ Fac. de Veterinaria, Las Placas 1550, Montevideo Uruguay - e-mail: rosagag@hotmail.com
Aprobado: 14/06/00

la raíz cuadrada (grupos sanguíneos simples con dominancia) y el método de Neiman-Sorensen (grupos sanguíneos complejos) (12).

La variabilidad genética se estimó mediante el Índice de Heterocigosidad medio esperado a partir de las frecuencias génicas según Guérin y Meriaux (6).

La eficiencia en el diagnóstico de paternidad para los 11 sistemas analizados en nuestro laboratorio se estimó por la probabilidad de exclusión. La misma se calculó a partir de las frecuencias alélicas, utilizando un programa informático desarrollado por Huguet y col. (7) basado en el algoritmo descrito por Ohno y col. (13).

RESULTADOS

Los 11 sistemas analizados (7 de grupos sanguíneos y 4 de polimorfismos proteicos) fueron polimórficos, siendo el sistema D el que presentó mayor número de alelos (N=9) (cuadro 1). Por ser el sistema que proporciona mayor información, se compararon sus frecuencias génicas con el Pura Sangre de Carrera de EEUU (3) y de Francia (6) (figura 1). Se observa que los alelos más frecuentes del sistema D en las tres poblaciones (uruguaya, francesa y norteamericana) fueron los mismos (Ddk, Dcg y Dbc),

El test de equilibrio génico para los sistemas proteicos (Al, Es, PGD, Tf) resultó ser no significativo (cuadro 2). El Índice de Heterocigosidad medio para los 11 loci presentó un valor de 0,411 (cuadro 3). El índice de heterocigosidad esperado por sistema (cuadro 3), muestra que los más polimórficos (D: 9 alelos y Tf: 6 alelos) son los de mayor I.H (0,761 y 0,728 respectivamente).

Se calculó el I.H. para los 11 loci de los PSC de EEUU (3) (7 grupos sanguíneos y Al, Es, PGD, Tf) obteniéndose un valor de 0,401.

La probabilidad de exclusión (PE) de

los sistemas con mayor heterocigosidad también fue mayor (D: 55,18% y Tf: 49,16%, cuadro 3).

DISCUSIÓN

El perfil genético de la muestra poblacional de PSC uruguayo analizada a partir de 11 marcadores sanguíneos resultó ser similar a las descritas en otras poblaciones de PSC (EEUU y Francia). Los alelos más frecuentes (Aa, Ca, K-, P-, U-, AlB, PGDF) también lo fueron en las poblaciones de PSC de EE.UU (2) y Francia (6).

Dentro del sistema D (figura 1) se encontraron las siguientes diferencias: a) la frecuencia del alelo Ddek (0,01) se presentó únicamente en la población uruguaya. b) el alelo Ddeo fue más frecuente en PSC uruguayo (0,08) que en el PSC de EEUU (0,031) y de Francia (0,012).

En cuanto a los polimorfismos proteicos, el sistema de Tf resultó ser el más polimórfico en las tres poblaciones siendo los alelos más frecuentes F1, D y F2 (cuadro 1) (2, 6).

Los resultados de variabilidad genética en PSC uruguayo se compararon con los de PSC de EEUU, describiéndose lo siguiente: a) en el año 1985, un IH=0,378 (14 loci) (2); b) en 1994, un IH=0,295 (19 loci) (4). Como puede verse, este índice varía según el número de loci estudiados, ya que en el primer caso se testó un 50 % de loci polimórficos y en el segundo un 36,8 %, disminuyendo el promedio y por lo tanto el IH. En este trabajo, el IH (0,411) fue mayor que los observados en las poblaciones de EEUU. Esta diferencia podría ser debida a que el cálculo del IH se realizó sobre un 54,5 % de loci polimórficos (11 loci). Por ello, se obtuvo el IH de EEUU (IH=0,401) para los 11 loci evaluados en la población de PSC uruguayo. Estos datos indicarían una mayor variabilidad genética en el PSC uruguayo con respecto al de EEUU,

los que se ven confirmados por el mayor número de variantes totales descrito en nuestra muestra (N=41) (cuadro 3) en relación a los 38 descritos para EEUU (2). Una de las causas que apoyaría esta diferencia sería la ausencia de inseminación artificial en esta raza equina, manteniendo cada población un perfil genético propio. Además, las diferencias encontradas entre estas poblaciones podrían deberse a una serie de características: a) distinto efecto fundador; b) distinta intensidad de selección artificial; c) distintos métodos de cría.

En relación a la PE en la población uruguaya, se obtuvo un 95,528 % (cuadro 3). Esta difiere levemente de aquella descrita en la población de EEUU (96 %). Mientras para la PE de EEUU se cuantificaron 20 loci, en este trabajo se utilizaron 9 loci menos. A pesar de esto, los valores observados fueron similares, quizás debido a una mayor variabilidad genética en nuestra población (IH=0,411). De acuerdo a lo descrito por Meriaux (11), ésta sería una de las causas que incidiría en la eficiencia de la PE, sin descartar los polimorfismos de los sistemas y sus frecuencias génicas relativas. Los tres sistemas más polimórficos (D, Q y Tf) encontrados en este trabajo fueron los que presentaron mayor PE (cuadro 3). Sin embargo, al comparar las frecuencias génicas del sistema D en la población de Uruguay (PE=55,18%) con la de EEUU (59 %), se observa que aquella población presenta un PE menor. Esta diferencia puede ser debida a que la distribución de las frecuencias de este sistema en la muestra de EEUU resultó ser más homogénea que la encontrada en Uruguay. La alta frecuencia del alelo Ddk en los PSC uruguayos con respecto a los demás alelos disminuye la PE del sistema (figura 1). Si se realiza un razonamiento similar, ahora, para el sistema Q de los PSC uruguayos y de EEUU, se observa que la distribución de frecuencias génicas resultó ser en este caso, más homogé-

nea en la población de Uruguay (cuadro 1) que para la de EEUU, siendo su PE mayor (PE=36,24 %) en relación con la de EEUU (PE=1 %).

Por lo expuesto, se considera que la distribución de frecuencias génicas entre los marcadores genéticos polimórficos analizados, tendría una mayor influencia sobre la probabilidad de exclusión que el número de alelos por sistema.

CONCLUSIONES

El perfil racial de la población de PSC uruguayo realizado a partir de marcadores sanguíneos presentó gran similitud con los estudios descritos en la raza PSC de otros países.

El Índice de heterocigosidad presentó un valor más elevado que el de la población de PSC de los EEUU, indicando un grado de variabilidad mayor. Esta mayor variabilidad genética determinó una PE de 95,528 %, considerándose elevada para los 11 loci testados.

La influencia de la distribución de las frecuencias génicas, además de los polimorfismos y el número de sistemas utilizados, deben ser considerados en los estudios de variabilidad genética.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Dra. Alicia Postiglioni por la lectura crítica y elaboración de la redacción del trabajo;

a la Sra. Iris Hernández por la preparación del material de laboratorio. A los Haras «Los Apamates» y al Campo Militar N° 1 «Los Cerrillos» perteneciente al Servicio Nacional de Remonta por dejar a nuestra disposición un plantel de animales a partir de los cuales se obtuvieron los reactivos.

El presente trabajo fue financiado por la CIDECE y la CSIC. (Universidad de la República, Facultad de Veterinaria).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- (1) Bengtsson, S.; Sandberg K. (1973). A method for simultaneous electrophoresis of horse red cell enzyme system. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*. (N° 4) 83-87.
- (2) Bowling, A. T. and Clark, R. S. (1985). Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics* (N° 16) 93-108.
- (3) Bowling A. T. and Williams M. J. (1991). Expansion of D system of horse red cell alloantigens. *Animal Genetics* (N° 22) 361-367.
- (4) Bowling A.T. (1994). Population genetics of Basin feral horses. *Animal Genetics* 25 (S.1): 67-74.
- (5) Bowling, A. T.; Eggleston-Stott, M. L.; Byrns, G.; Clark, R. S.; Dileanis, S.; Wictum, E. (1997). Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Animal Genetics*. (N° 28) 247-252.
- (6) Guérin G, Mériaux J. C. (1986) La distribution des marqueurs sanguins dans

les races equines. Analyse sur un échantillon de Pur-sang, Trotteur Français et Selle Français. 12° Journee D'Etude. CEREOPA pp 13.

(7) Huguet E., Carracedo A. and Gené M. (1988) Introducción a la investigación biológica de la paternidad. PPU. Barcelona (8) Juneja A.K., Ghane B., Sandberg K. (1978). Genetic polymorphism of the vitamin D binding protein and another post-albumin protein in horse serum. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics* (N° 9) 29-36.

(9) Kelly y Postiglioni. (1998) Marcadores Genéticos en equinos: II- Su aplicación en la práctica veterinaria. *Veterinaria*. Octubre - Diciembre 1997. Año 59, Vol. 33. (N° 136). 10 - 12.

(10) Marklund, S.; Ellegren, H.; Eriksson, S.; Sandberg, K.; Andersson, L. (1994). Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics*. (N° 25). 19 - 23.

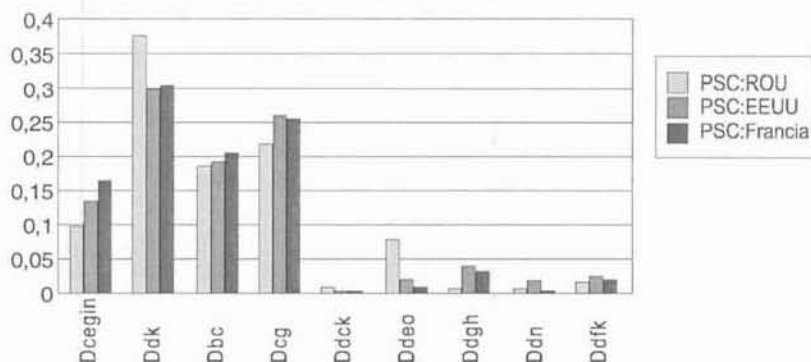
(11) Meriaux, J. C. (1981). Les groupes sanguins des chevaux et leurs utilisations pratique pour l'identification et le controle de filiation. *P4 Cheval*. (N° 127) 533-548.

(12) Neimann-Soerensen A. (1956). Blood groups and breed structure as exemplified by three Danish breeds. *Acta Agr. Sacand*. (N° 6) 115.

(13) Ohno Y., Sebetan I. M. and Akaishi S. (1982) A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles. *Forensic Science International* (N° 19) 93-98.

(14) Stormont C., Suzuki Y. (1964). Genetic systems of blood groups in Horse. *Genetics* (N° 50) 915-929.

Figura N° 1: Comparación entre frecuencias génicas del sistema D en PSC de Uruguay, EEUU(3) y Francia(6)



Cuadro Nº1: Frecuencia génica de los sistemas de grupos sanguíneos y polimorfismos proteicos del PSC uruguayo

Grupos Sanguíneos	Alelos	Frecuencias génicas	Polimorfismos proteicos	Alelos	Frecuencias génicas
A	ag	0,005	A1	A B	0,005
	a	0,838*			0,121
	-	0,152			0,879
	c	0,005			
C	a	0,650	Es	I S F	0,885
	-	0,350			0,060
					0,055
D	cegin	0,095	Tf	D F1 F2 H O R	0,298
	dk	0,375			0,374
	bc	0,185			0,172
	cg	0,220			0,020
	dek	0,010			0,081
	deo	0,080			0,055
	dgh	0,010			
	dn	0,005			
	dfk	0,020			
K	a	0,050	PGD	F S	0,574
	-	0,950			0,426
P	a	0,068			
	b	0,057			
	ac	0,152			
	-	0,723			
Q	c	0,031			
	ac	0,056			
	-	0,422			
	abc	0,426			
	b	0,066			
U	a	0,100			
	-	0,900			

* En negritas se resalta el alelo más frecuente

Cuadro Nº2: Test de equilibrio génico para los cuatro polimorfismos proteicos en PSC uruguayo

SISTEMA	GR. DE LIBERTAD	χ^2	PROBABILIDAD
ALBUMINA	1	0,18392	>0.500
ESTERASAS	3	3,42988	>0.250
PGD	1	0,23099	>0.500
TRANSFERRINAS	15	8,401719	>0.900

Cuadro Nº 3: Probabilidad de exclusión e Índice de heterocigosidad individual y global calculados en PSC uruguayo a partir de 11 loci

LOCI	Nº ALELOS	IH	P.E. (%)
A	4	0,275	12,44
C	2	0,455	17,57
D	9	0,761*	55,18*
K	2	1,095	4,52
P	4	0,446	25,05
Q	5	0,632*	36,24*
U	2	0,180	8,19
ALB	2	0,241	10,59
ES	3	0,210	10,77
TF	6	0,728*	49,16*
PGD	2	0,499	18,64
Total	41	0,411	95,528

* En negrita se marcan los sistemas que presentan un mayor Índice de Heterocigosidad y Probabilidad de Exclusión