

Marcadores genéticos en equinos: I-Actualizaciones de metodologías.

Kelly, E.L. (*); Postiglioni, A. (*).

INTRODUCCIÓN

En la sangre de equinos se identifican diversos marcadores genéticos (MG) siendo los más usados, hasta el momento, los grupos sanguíneos y los polimorfismos bioquímicos. La determinación de estas dos categorías se denomina tipificación sanguínea (18). El estudio y desarrollo de técnicas serológicas y electroforéticas utilizadas para la detección de dichos polimorfismos, han sido estandarizadas en diferentes Laboratorios siendo éstas una de las herramientas más eficientes en el control de filiaciones e identificación individual a nivel internacional. Hoy se le adicionan los polimorfismos a nivel molecular, lo que aumenta el número de MG. Estas técnicas permiten realizar el análisis de la estructura genética de las poblaciones y su comparación con otras razas de la misma especie.

Estas tres técnicas (grupos sanguíneos, polimorfismos proteicos y de ADN) están avaladas por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) mediante el test de Comparación Internacional que bianualmente se realiza entre todos los laboratorios que trabajan en dicha área y que son sus miembros institucionales.

Hace ya algunos años que en varios países (Brasil, Argentina, EEUU, España etc.) se está exigiendo la tipificación sanguínea a los productos inscriptos en el Stud Book. Recientemente en el Uruguay se publicó una resolución del Stud Book Uruguayo, determinándose la realización de la tipificación sanguínea de los padrillos Pura Sangre de Carrera (PSC) y de las

yeguas de primera parición, basándose en una reglamentación vigente desde el año 1985 del "International Stud Book Comitties" ("El País", 11/06/95).

El Area Genética de la Facultad de Veterinaria comenzó a instrumentar esta línea con el propósito de brindar al medio productivo la tipificación sanguínea y de ADN en las diferentes razas equinas criadas en nuestro país así como el realizar trabajos de investigación sobre la estructura genética de nuestras poblaciones equinas.

Se considera necesario entonces una revisión de los MG utilizados actualmente en la especie equina con la finalidad de:

- 1) Compilar y actualizar el conocimiento científico de los MG en equinos.
- 2) Difundir las aplicaciones en el área del diagnóstico, prevención de enfermedades y mejoramiento genético, entre los colegas y lectores.
- 3) Realizar una evaluación, según su eficiencia, para tipificación y diagnóstico de paternidad.

Para una mejor comprensión del texto se ha realizado un glosario que incluye los términos y abreviaturas utilizadas en esta parte y en la parte II. "Su aplicación en la práctica veterinaria".

MÉTODOS APLICADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS.

Grupos sanguíneos.

Los grupos sanguíneos en equinos fueron descubiertos por Podliachouk en

1957 (19), usando anticuerpos naturales. El mayor interés en el estudio de estos MG fue generado por el descubrimiento de la isoeritrolisis neonatal en caballos y mulas como resultado de una inmunización transplacentaria (1). El gran avance en el desarrollo de las técnicas y conocimiento de los grupos sanguíneos en esta especie fue realizado por Stormont y Suzuki (24). Estos autores descubrieron que los grupos sanguíneos estaban determinados genéticamente por varios loci o sistemas, presentando algunos de los mismos (A, D, P y Q) varios alelos, mientras los demás (C, K, T, U) presentaban una herencia con dominancia completa de dos alelos.

De acuerdo a las reglas de la nomenclatura internacional, (ISAG, 1974) se designan los sistemas con letras mayúsculas y los factores con la letra del sistema al que pertenecen seguida de una letra minúscula. Los sistemas más complejos son el A y el D ya que sus factores se heredan agrupados denominándose fenogrupos. En el sistema D se determinaron 25 fenogrupos y 17 factores. Luego se han descrito otros fenogrupos nuevos como: Dadeo (6), Ddlno (4) y D(c)eg (13)

Actualmente son reconocidos por el ISAG (1992) 34 factores sanguíneos agrupados en 7 sistemas de grupos sanguíneos (Cuadro 1).

El análisis de tipificación sanguínea en equinos se realiza mediante las técnicas serológicas de aglutinación y de hemólisis.

Los reactivos de tipificación sanguínea se preparan a partir de antisuero inmune y se

Aprobado: 9/12/96

* Laboratorio de Citogenética Animal. Area Genética.

Facultad de Veterinaria. A.Lasplacas 1550. Montevideo. Uruguay.

Cuadro 1: Nomenclatura de la tipificación sanguínea según la Sociedad Internacional de genética Animal en 1995 (ISAG). Sistemas de grupos sanguíneos equinos.

Sistema	Factores	Alelos reconocidos
A	a,b,c,d,e,f,g	Aa, Aadf, Aadg, Aabdg, Ab,Abc, Abce,Ac,Ace,Ae,A-
C	a	Ca,C-
D	a,b,c,d,e,f,g,h,I,j, k,l,m,n,o,p,q	Dadl,Dadlnr,Dadlr,Dbcmq,Dcefgmq,Dceginmq,Dcfcgkm, Dcfmqr,Dcgm,Dcgmpr,Dcgmqr,Dcgm, Ddeklqr,Ddeloq,Ddelq, Ddfklr,Ddghmp,Ddghmq,Ddghmqr,Ddkl,Ddlnq,Ddlnqr,Ddlqr,Dq (D-)*.
K	a	Ka,K-
P	a,b,c,d	Pa,Pac,Pacd,Pad,Pd,Pbd,Pd,P-
Q	a,b,c.	Qabc,Qac,Qb,Qc,Q-
U	a	Ua,U-

Sistemas electroforéticos.

Sistema	Símbolo del locus	Alelos reconocidos
A1B glicoproteína	A1B	FKS
Albúmina	Al	ABI
Fosfatasa ácida	Ap	FS
Anhidrasa carbónica	CA	EFILOS
Catalasa	Cat	FS
NADH-diaforasa	Dia	FS
Carboxilesterasa	Es	FGHI(L)(M)ORS
Proteína unida a vitamina D	Gc	FS
Glucosa fosfato isomerasa	GPI	F(L)S
Hemoglobina alfa	Hb	A AII BI BII (C) (N) (V)
Peptidasa A	Pep A	FS
6-fosfato deshidrogenasa	PGD	DFS
Fosfoglucomutasa	PGM	FSV
Proteasa inhibidor	Pi	FGHIKLL2NOPQRSTUWVZ
Plasminógeno	PLG	T2
Transferrinas	Tf	D(D1 D2 D3)F1 F2 (F3) (G) H1 H2 J M O R

* Los paréntesis indican variantes reconocidas pero los datos de familia no han sido aun publicados

purifican mediante técnicas de absorción con glóbulos rojos según Stormont y Suzuki (24) con modificaciones (25;10).

El sistema A es definido por reacciones de aglutinación y hemólisis, los sistemas D y K sólo por aglutinación y los sistemas C,P,Q, y U predominantemente por hemólisis.

Polimorfismos protéicos.

En el plasma sanguíneo y glóbulos rojos existen muchas proteínas que cumplen diversas funciones como ser: la de transporte (Transferrina:Tf), la de mantenimiento de la presión osmótica

(Albumina:Al) y las enzimáticas que intervienen en el metabolismo de la glucosa en los glóbulos rojos (6-fosfoglucomutasa:PGM).

La técnica utilizada para determinar polimorfismos en las proteínas sanguíneas corresponde a la electroforesis en geles de almidón aplicada en equinos a partir del año 1964.

Más tarde, se desarrolla la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), permitiendo fenotipar simultáneamente, según el gradiente de poros del gel, varias proteínas diferentes del plasma como por ejemplo: las transferrinas,

posttransferrinas, albúminas y postalbúminas (11;12).

Un ejemplo de ello lo podemos ver en la foto 1, en la que se muestran los resultados obtenidos al correr 8 muestras para las siguientes proteínas sericas:Al,proteína ligada a la vitamina D (Gc),Esterasa (Es), A1B glicoproteína (A1B) y Tf.

Genéticamente cada proteína es codificada por un gen estructural (locus o sistema protéico) y cada variante electroforética de esa proteína es controlada por un alelo.

MUESTRAS DE SUERO DE N ANIMALES

Nº:	1	2	3	4	5	6	7	8
Al:	AB	AB	AB	AB	BB	AB	BB	AB
Gc:	FF	FF	FF	FF	FF	FF	FF	FF
ES:	FF	FI	FI	II	FF	II	FF	II
A1B:	KK	KK	KK	KK	KK	KK	KS	FK
Tf:	F ₁ O	F ₁ F ₁	F ₁ F ₂	DO	F ₁ F ₂	F ₁ F ₂	F ₁ R	F ₁ F ₂



Foto 1 : Electroforesis en gel de Poliacrilamida. Se analizaron 8 muestras de suero equino para los siguientes sistemas: Al, Gc, Es, A1B, Tf. A la izquierda se colocaron los genotipos correspondientes a cada muestra. (Muestras analizadas en el Laboratorio de Grupos sanguíneos de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España)

Los alelos que controlan las variantes electroforéticas son codominantes y por tanto el genotipo de un individuo se puede determinar a partir del fenotipo.

Actualmente con el desarrollo de estas técnicas el número de sistemas genéticos proteicos descritos en equinos son de 16, superando al de los grupos sanguíneos.

En la tabla 1, se pueden observar los 16 sistemas siendo los más polimórficos las Tf y el Inhibidor de la Proteasa (Pi).

Los tipos de polimorfismos proteicos más utilizados para realizar tipificación sanguínea en equinos corresponden a:

Polimorfismos eritrocitarios: Hemoglobina (Hb), fosfato glucosa isomerasa (PGD), fosfoglucomutasa (PGM) y glucosa fosfato isomerasa (GPI). Estas últimas se separan en gel de almidón según la técnica de Bengtsson y Sandberg (2).

La Hb es una proteína que presenta una forma de migración rápida (A) y otra de migración más lenta (B) las que actualmente con la técnica de focalización isoelectrica en PAGE (5) se han podido distinguir nuevas variantes (Tabla 1).

Polimorfismos de proteínas séricas: Pi, Al, Gc, ES, A1B, Tf. Estos se analizan mediante electroforesis horizontal simultánea en gel de PAGE a pH alcalino 8,9 según Juneja y col (12). (Cuadro 1, foto 1).

Las Pi han mostrado ser muy variables,

encontrándose actualmente 19 alelos (Cuadro 1). Estas presentan alelos característicos de raza como por ej. la Pi O, que está presente únicamente en la raza Arabe (3) o la variante W que sólo se ha encontrado en el Caballo Pura Raza Española (PRE) (14).

El sistema electroforético de Albúminas presenta tres variantes alélicas (A, B, I) que son controlados por alelos autosómicos.

El sistema Gc es una proteína ligada a la vitamina D. Juneja y col. (12) detectaron 2 alelos autosómicos codominantes designados como F y S que migran en la zona de postalbúminas.

Es un sistema poco polimórfico en el caballo con gran predominio de la variante F.

Las esterasas se determinan en geles de almidón y en poliacrilamida, encontrándose diferentes variantes con comportamiento codominante (F, G, H, I, S) excepto la variante O, que estaría determinado por un alelo recesivo.

Las variantes de las esterasas se distribuyen con diferente frecuencia según las razas, siendo en algunos casos específicos de raza, por ej. en los caballos Arabes aparece la Es G que no se encuentra en PSC. La A1B presenta 3 variantes: F, K y S con muy poca variabilidad genética en las diferentes razas equinas (20).

Las Tf pertenecen a las beta globulinas y es uno de los sistemas mas polimórficos presentando 14 alelos. (Cuadro 1). En este sistema existen variantes de migración rápida (D, F₁, F₂, H y J) y variantes de migración lenta (M, O y R) (5).

Las frecuencias alélicas de las Tf varían según las razas siendo en los caballos ligeros (PSC, Arabe) más frecuente la D y F, en cambio en los caballos pesados y de tiro (Bretón, Hispano-Bretón) la más frecuente es la H.

Esta característica puede ser usada para marcar diferencias raciales entre estos dos grupos (15).

También se describió otro alelo Tf J por Andrés Cara y Kaminski (7) presente en Pura Raza Española (PRE) y en las razas que descienden de ésta.

Polimorfismos de ADN.

Recientemente, las técnicas de genética molecular brindan información directa de la molécula de ADN, permitiendo aumentar el número de sistemas polimórficos. Varios métodos de detección han sido utilizados para analizar los polimorfismos de ADN. Entre ellos tenemos: amplificación de DNA *in vitro* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) combinada o no con el polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP), amplificación de polimorfismos de DNA al azar (RAPD) y PCR-Microsatélites y Southern blot (22) (ver glosario).

Actualmente, en equinos, se le da una prioridad especial a los microsatélites debido a su alto grado de polimorfismo (8-16). En el genoma eucariótico parte del ADN repetido, se expresa como microsatélites siendo estas secuencias de dinucleótidos o tetranucleótidos repetidas en tandem, como es el caso de los poly(TG)_n (n= N° de dinucleótidos).

Este dinucleótido es cuantitativamente uno de los más abundantes encontrados en mamíferos (9). Los microsatélites que son seleccionados para ser usados como marcadores genéticos, deben presentar un buen grado de polimorfismo y ser estables, son los que tienen un n mayor de 10 y menor de 30.

El análisis de los loci de microsatélites se realiza por amplificación de la región repetida de ADN mediante PCR, usando "primers" (oligonucleótidos) complementarios a la secuencia que flanquean la región repetida y que son específicos de

Cuadro2: Microsatélites de equinos.

Nombre de Microsat.	Nº de Alelos	PIC.*	HeterocigProm.	P.E.**
VHL 20 (28)	10	0.8-0.7+	0.8-0.7	0.5-0.6
HMS1(26)	4	0.6	0.66	-
HMS2	8	0.74	0.77	-
HMS3	7	0.66	0.7	-
HMS5	3	0.66	0.7	-
HMS6	5	0.66	0.71	-
HMS7	6	0.71	0.75	-
HMS8	5	0.6	0.26	-
HTG2(43)	3	0.35	0.42	0.09
HTG3	5	0.54	0.58	0.39
HTG4	6	0.72	0.76	0.22
HTG5	7	0.39	0.40	0.06
HTG6	4	0.60	0.67	0.30
HTG7	4	-	-	0.28
HTG8	7	-	-	0.31
HTG9	5	-	-	0.19
HTG10	7	-	-	0.53
HTG11	5	-	-	0.20
HTG12	4	-	-	0.18
HTG13	10	-	-	-
HTG14	5	-	-	0.41
HTG15	5	-	-	0.30

* PIC: contenido de información polimórfica.(ver glosario)

** PE: Probabilidad de Exclusión para el PSC excepto para el VHL20. que incluye otras razas (ver glosario).

+ Promedio para las razas estudiadas.

cada locus (21). Luego de ser amplificados se analizan los diferentes polimorfismos simplemente comparándose el tamaño de los fragmentos amplificados con un marcador de peso molecular en un gel de poliacrilamida (6%), y realizándose la interpretación de los genotipos según el peso molecular de las bandas formadas.

Los microsatélites presentan las siguientes características según Stalling y col.(23):

- ser muy frecuentes pues se estiman que existirían entre 50 y 100.000 loci repartidos en el genoma eucariótico .

- presentar un alto grado de variación en el número de repeticiones de la secuencia.

- presentar herencia mendeliana.

Ellegren y col. en 1992 (8), describen por primera vez en equinos 5 loci de

microsatélites (HTG2, HTG3, HTG4, HTG5, HTG6). Hoy existe un número significativo de microsatélites en equinos, los que se resumen en parte en el cuadro 2.

EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS Y CONCLUSIONES.

La tradicional tipificación sanguínea y electroforesis de sistemas proteicos siguen siendo un apoyo fundamental a los programas de mejoramiento genético.

El diagnóstico de paternidad basado en la determinación de dichos marcadores nos avala con gran precisión la selección de los reproductores equinos.

Además se considera que es un método técnicamente inalterable, por lo que se utiliza para la identificación individual, es decir que por estas técnicas se protege el exacto registro del animal.

A continuación vamos a hacer una evaluación, de acuerdo a la eficiencia de las tres técnicas descriptas para ser usadas como método de rutina en el diagnóstico de paternidad. Si consideramos la eficiencia en el diagnóstico de paternidad a través de la probabilidad de exclusión (PE), vemos que en el caso de los grupos sanguíneos debemos realizar un análisis de familia para determinar los genotipos individuales por ser en su mayoría sistemas con dominancia completa.

Mientras que en los polimorfismos bioquímicos y microsatélites, el fenotipo y genotipo se igualan en su expresión por ser codominantes.

Los microsatélites particularmente, detectan mayor grado de polimorfismos que los obtenidos por variantes proteicas, ya que éstos, por ser una expresión directa del genoma, nos permiten determinar todas las mutaciones que ocurren en esas secuencias nucleotídicas.

Los estudios que se han realizado con diferentes MG y en los que se evalúan su eficiencia mediante la PE, nos indican que aquellos trabajos en los que se utilizan métodos convencionales, presentan una PE similar a aquella obtenida analizando un menor número de loci de microsatélites.

Catorce loci testados en PSC con técnicas convencionales tienen una PE de 0.96 (3), mientras que para la misma raza, 8 loci de microsatélites obtienen una PE de 0.96 (16). Sin embargo, para el caso de los sistemas convencionales, si se utilizan los loci más efectivos (sistema D de grupos sanguíneos, Tf y Pi de sistemas polimórficos proteicos) se tiene un PE teórico que varía entre 0.86 a 0.98 dependiendo de la raza estudiada, por lo cual los loci adicionales contribuyen sólo ligeramente en el total de la PE (3).

Lo mismo ocurre con los microsatélites por ejemplo si se utilizan 5 loci con una PE individual de 0.54, la PE promedio es de 0.98 y si se usaran 10 loci de ese tipo la PE podría alcanzar más de 0.9996. (8).

En ambos casos ocurre algo similar ya que si se acumula la información de muchos sistemas independientes, la efi-

ciencia toma la forma de una asíntota que tiende hacia el 100%.

Por lo tanto, la ganancia en eficiencia aportada por un nuevo sistema, es relativamente despreciable. (17).

Algunos autores (8,16) consideran que los microsatélites, son ideales para estandarizar el test de paternidad en caballos, debido a su abundancia y la posibilidad de automatizar el procedimiento de tipificación. por ejemplo mediante un equipo (Applied System) Sin embargo en nuestros países sigue siendo muy honeroso realizarlo automáticamente .

Para hacer la técnica manualmente , lo cual reduciría los costos de equipos pero implicaría mas labor y mayor tiempo en su ejecución, sería conveniente seleccionar por su elevado PIC, un número reducido de loci de MS.

En base a estas conclusiones es que actualmente el uso de los microsatélites sería recomendable para casos de paternidad no resuelta por los test convencionales de tipificación sanguínea.

El poder contar entonces, con un Laboratorio de referencia en la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, en el que se ofrece el servicio de tipificación sanguínea, es de gran relevancia en la producción y pureza racial equina y por ende una herramienta muy útil en el quehacer veterinario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGAR N. S. (1983). *Red Blood cells of domestic mammals*. Ed. N.S. Agar and P.G. Bogard. Amsterdam. pp.420.
2. BENGTSOON S., SANDBERG K.(1973). A method for simultaneous electrophoresis of four horse red cell enzyme systems. *Anim. Blood Grps. biochem. Genet.* 4:83-87.
3. BOWLING A.T.Y CLARK R.S. (1985). *Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States.* *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 16: 93-108.
4. BOWLING A. T. Y WILLIAMS M. J. (1991). Expansion of the D system of horse red cell alloantigens. *Animal Genetics.* 22:361-367.
5. BRAEND M. Y STORMONT C. (1964). *Studien on hemoglobin and transferrine types. of horses.* *Nord. Vet. Med.* 16:31-37.
6. COTHREN E.G., LONG Y.G. (1994). A new phenogroup in the horse D system of red cell alloantigens found in the Caspian pony. *Animal Genetics.* 25:49-50.
7. DE ANDRÉS CARA, D.F.; KAMINSKI M. (1987). The inheritance of transferrin J in andalusian horse breed. *Ann. Genetics.* 18 sup.1:51-52.
8. ELLEGREN H., JOHANSSON M., SANDBERG K., ANDERSSON L. (1992). Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim. Genetics.* 23:133-142.
9. EPPLEN J.T. (1988). On simple repeated GAT/CA sequences in animal genomes: a critical reappraisal. *Journal of Heredity* 79:409-17.
10. GAGLIARDI R.; KELLY E.L. (1995). Investigación en un suero polivalente de anticuerpos producidos contra eritrocitos equinos. VII Jornadas Científicas de la Soc. de Biociencias. Piriápolis. Uruguay.
11. GAHNE B.; JUNEJA R.K.; GROLMUS J. (1977). Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle. *Anim. Blood Grps. biochem Genet.* 8:127-137.
12. JUNEJA A.K., GHANE B., SANDBERG K. (1978). Genetic polymorphism of the vitamin D binding protein and another post-albumin protein in horse serum. *Anim. Blood. Grps. Biochem. Genet.* 9:29-36.
13. KAKOI H., GAAWAHARA H., MIURA N. (1995). Unusual D system inheritance in Anglo-Arab horse. *Animal Genetics.* 26:53-54.
14. KAMINSKI M., Y DE ANDRÉS CRA D.F. (1986). Electrophoretic markers of Andalusian Horses: comparison of Spanish and Lusitanian linages. *Comparative Biochemistry and Physiology* 83B(3):575-588.
15. KAMINSKY M. (1965). Serum protein in equidae: species, race and individual differences. *Proc. 9th. Europ. Anim. Blood Group Conference Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.* 245-251.
16. 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. *Anim. Genet.* 25:19-23.
17. MERIAUX J.C. (1981). Les groupes sanguins des chevaux et leurs utilisation pratique pour l'identification et le controle de filiation. *P4 Cheval.* 127:533-548.
18. MORTARI N. (1990). Estudios de tipos sanguíneos em Bovinos selecionados para leite e para corte da raza Gir (Bos indicus) criada no Brasil. Tesis de doctorado, Unversal Estadual de Campinas. Instituto de Biologias pp. 231.
19. POLIAUCHUK L. (1957). Les antigenes des groupes sanguins des equides et leurs transmission hereditaire. *These Doc. Es-Sci, Paris.*
20. RODRIGUEZ P.P. (1991). *Medicina Militar.* 47: N°3:229-233.
21. SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., EHRLICH H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91.
22. SÁNCHEZ A., MEDRANO J.F. Marcadores moleculares en sanidad y producción animal. *Sanidad, Patología y producción animal.* pp 20-31.
23. STALLING R.L., FORDA F., NELSON D., TORNEY D.C., HILDEBRAND C.E., YMOYZIS R.K. (1991). Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in human genomes. *Genomics* 10:807-815.
24. STORMONT C., SUZUKI Y. (1964). Genetic Systems of blood groups in Horse. *Genetics* 50:915-929.
25. TRIAS P., KELLY E. L. (1995). Obtención de reactivos de grupos sanguíneos equinos. VII Jornadas Científicas de la Soc. de Biociencias. Piriápolis. Uruguay.

LABORATORIO
Resam

GUAYAQUI 3095 - MONTEVIDEO - URUGUAY - C.P. 11300
TELS.: 708 66 95 - 708 40 23 (FAX)

Dis: G. J.