

Marcadores genéticos en equinos: II-Su aplicación en la práctica veterinaria.

Kelly, E. L. y Postiglioni, A.

La eficiencia de los marcadores genéticos (MG), para ser aplicados en la práctica veterinaria (verificación de filiación, identificación, especificidad racial, diagnóstico y prevención de isoelectrólisis neonatal) se evalúa mediante el "Contenido de Información Polimórfica" (PIC). Este se encuentra relacionado con el número promedio de repetidos del marcador, el cual depende de tres variables: a) el número total de alelos; b) la frecuencia genética de cada alelo y c) el número de repetidos de ese alelo (30). Por ejemplo los microsatélites seleccionados por su grado de información son aquellos cuyo PIC tiene un valor alto (entre 1 y 0.8).

A continuación vamos a considerar las aplicaciones de los MG en la práctica veterinaria.

1. Identificación individual.

Debido a su alto grado de polimorfismo, los MG son considerados métodos certeros e inalterables para la identificación de animales permaneciendo constantes a lo largo de toda su vida. Sin embargo, en el caso de los grupos sanguíneos y polimorfismos proteicos es recomendable que los análisis se realicen luego de las primeras semana de vida, debido a que los antígenos eritrocitarios se expresan débilmente y presentan algunas variantes proteicas fetales (16).

Tomando en cuenta 15 sistemas (8 polimorfismos proteicos y 7 Sistemas de grupos sanguíneos) el número de fenotipos posibles asciende a un trillón, siendo muy poco probable que dos equinos elegidos al azar de una población tengan el mismo tipo sanguíneo (28). Estos MG han resultado ser similares a una huella dactilar humana.

2. Diagnóstico de paternidad.

El análisis de tipificación sanguínea es un método accesible, económico y presenta una elevada probabilidad para la exclusión de paternidades falsas. Esta se basa en la comparación de los hemotipos

del producto y sus padres presuntivos. Según Meriaux (17) para establecer la incompatibilidad de una filiación existen dos reglas de exclusión:

- Cuando el producto no contiene un alelo presente en uno de sus padres.
- Cuando el producto contiene un alelo inexistente en sus padres.

En el cuadro 1 se ilustra un caso en que se excluye un producto basado en las reglas anteriormente mencionadas.

La efectividad del test se calcula como la probabilidad de exclusión (PE) para detectar paternidades incorrectas. De acuerdo a Meriaux (16) la PE va a depender de:

- La variabilidad genética de cada raza. Si tomamos por ejemplo el trabajo de Rodríguez (23) en el que considera 10 sistemas de electroforesis (PGP, PGM, PHI, Hb, A1B, Pi, Al, Gc, Es, Tf) la PE va a tener un valor de: 91.41% para el caballo Pura Raza Español (PRE); de 87.89% para el PSC (Pura Sangre de Carrera) y de 90.26% para el Árabe. La

PE de nuestro Laboratorio fue calculada en PSC, siendo su eficiencia para 13 loci de 95,13%, lo que significa que en el 95,13% de los casos de paternidad doble, el laboratorio puede determinar la compatibilidad con uno de los padrillos y la incompatibilidad con el otro (12). En el caso de los microsatélites la PE promedio para 14 loci (HTG) es de 0.96 para PSC. (15).

- Polimorfismo del sistema. Este va a estar dado por el número de alelos y sus frecuencias relativas en la raza.
- Las relaciones de dominancia. Los alelos de cada sistema expresan como codominantes o dominancia-recesividad.

Con respecto a la eficiencia de los sistemas, esta será mayor cuando:

- existe un número elevado de alelos en el sistema,
- los alelos tienen un mecanismo de herencia codominante
- los alelos presentan una frecuencia genética similar.

Cuadro 1: Exclusión de paternidad basado en dos sistemas: D y Tf.

	Sistema D	Sistema Tf
Producto Madre Padre	Cegin/dgh Cegin/dln bc/delo	DH DH F2R
	b) El producto lleva una alelo (dgh) que no pertenece a ese padre.	a) El padre no le ha transmitido al hijo ningún alelo: F2 o R.

Los sistemas más eficientes, determinados por tipificación sanguínea, son el sistema D de grupos sanguíneos y los sistemas Tf y Pi de electroforesis.

Existen varios casos en los que es aconsejable realizar la determinación de paternidad. Entre ellos tenemos: yeguas que repiten el celo luego de ser cubiertas y se las sirve con otro semental, gestaciones muy cortas o largas, reproducción en libertad, incompatibilidad de capa de un producto con sus padres, inseminación artificial. (21). En el caso de que sea necesario el envío de muestras al Laboratorio, es aconsejable se respeten las instrucciones que se indican a continuación:

3. Prevención y diagnóstico de la isoertrólisis neonatal.

Mediante el test de tipificación sanguínea se pueden evitar pérdidas económicas producidas por la muerte de pitorrillos a causa de esta patología. Por un lado evitando que las crías tomen el calostro de madres que presenten títulos altos de anticuerpos contra determinados grupos sanguíneos. Por otro lado planificando los apareamientos para evitar el cruzamiento de individuos cuyos grupos sanguíneos son incompatibles y que conducen a la producción de dicha enfermedad.

Los factores sanguíneos que se consideran relacionados con la etiología de dicha enfermedad corresponden al factor a del sistema A y al factor a del sistema Q (3).

4. Transfusiones sanguíneas.

La primera transfusión se puede realizar sin tener reacciones adversas, debido a que son muy poco frecuentes los anticuerpos naturales contra glóbulos rojos en equinos.

Luego de esta primera transfusión el animal receptor queda sensibilizado para futuras transfusiones. De acuerdo a Wong (31) los anticuerpos contra Aa pueden persistir como mínimo por un año luego de la transfusión. Para evitar accidentes en los individuos receptores de transfusión o en las madres que conducen a producir la isoertrólisis neonatal, lo más conveniente es seleccionar los donantes por su grupo sanguíneo antes de realizar la transfusión. También, se puede seleccionar, en principio, como donante de una transfusión de sangre entera, un caballo de la misma raza que el receptor. En este caso existe una mayor probabilidad de que compartan grupos sanguíneos similares existiendo menos posibilidad de producir accidentes por transfusión. En el Cuadro 2 se muestran las frecuencias en diferentes razas del alelo negativo de los factores antigénicos que producen accidentes en transfusiones (Aa y Qa) (3,29). También se puede apreciar en dicho Cuadro que los caballos Shetland Ponies tienen una alta frecuencia de los alelos Aa y Qa negativos por lo cual el uso de estos individuos como donantes de sangre tendrían menor posibilidad de producir respuesta inmune. Sin embargo, se debe recalcar que, en estos casos, siempre existe un riesgo de que el receptor y por lo tanto lo más conveniente sería realizar la tipificación sanguínea del donante y del que se sensibiliza para seleccionar el mejor donante para la transfusión.

INSTRUCCIONES PARA LA REMISIÓN DE MUESTRAS.

- Se debe realizar la extracción sanguínea de 10 ml de sangre con anticoagulante y de 10 ml de sangre sin anticoagulante. Para el caso de que se quiera realizar tipificación de ADN se puede enviar sangre con antiacoagulante o pelo, piel etc.
- Para diagnóstico de paternidad es conveniente analizar las muestras de: madre, cría y del padre, en el caso de que exista duda, también la sangre de los posibles padres.
- Luego de la extracción la sangre debe ser conservada refrigerada hasta que se realice el análisis y es conveniente remitirla al laboratorio lo antes posible, pues se deteriora rápidamente.
- La sangre sin anticoagulante se debe dejar a temperatura ambiente unos 15 a 20 minutos para que se contraiga bien el coágulo y libere el suero, luego se refrigera.

SAN JORGE IBR-DVB

El complemento efectivo en la prevención de las enfermedades respiratorias, reproductivas y nerviosas.

San Jorge I.B.R. actúa sobre las distintas manifestaciones clínicas atribuidas al virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina.

REPRO POLIVAC

La vacuna múltiple que asegura altos porcentajes de preñez.

Vacuna contra Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Diarrea Vial Bovina, Leptospirosis y Campylobacteriosis.



LABORATORIO URUGUAY S.A.

J. J. DESSALINES 1831/35 Tel.: 619 29 45
Montevideo - Uruguay



San Jorge-Bagó

CALIDAD QUE SE EXPORTA

5. Aplicaciones en Investigación genética.

Mediante los MG se pueden realizar estudios referentes a la estructura genética poblacional, y evolutivos.

Los MG en razas equinas (6; 9; 4; 20) presentan una diferente distribución de sus frecuencias génicas, así como la presencia de alelos propios de determinadas razas (Ej. La transferrina J en PRE). (24). Por lo tanto, a través del estudio de los marcadores genéticos podemos conocer el perfil genético de una raza y según la distribución de sus alelos, se pueden estudiar las relaciones existentes entre razas y predecir su formación (11, 19). Estos estudios se están realizando en el Área Genética, a efectos de caracterizar genéticamente nuestra raza de Caballos Criollos y determinar la relación genética con sus razas ancestrales como el PRE (7).

Los MG también nos permiten estudiar e ir evaluando el mantenimiento de la biodiversidad genética de las razas. Esta variabilidad genética en poblaciones de animales de interés pecuario es un requisito para el progreso de la selección, así como para que tenga lugar la evolución. El uso de diferentes métodos de cría nos alteran la variabilidad genética por ejemplo los cruzamientos entre razas aumenta la variabilidad, mientras que la selección y particularmente la endocría conducen a un decrecimiento de la misma. (9, 13). Sobre este tema se han realizado diversos estudios, entre ellos los de Guerin y Meriaux (9), Bowling y Clark (4) y Marklund y col. (15) basados en MG bioquímicos, de grupos sanguíneos y moleculares, respectivamente en diferentes razas equinas. En los tres estudios la variabilidad genética de los PSC resultó ser la menor (0.388, 0.37 y 0.27 respectivamente). Lo cual concuerda con el origen de dicha raza en cuya formación se utilizaron un número restringido de individuos, combinada con una intensa selección para un rasgo de alta heredabilidad y con un StudBook cerrado durante casi 2 siglos (4).

Otro tema que se está investigando es la asociación de los MG con caracteres de interés productivo y enfermedades, con la finalidad de usar los MG para realizar selección asistida por marcadores genéticos (MAS). De acuerdo a sus correlaciones con caracteres de importancia económica o de enfermedades hereditarias, se podrían utilizar además como una herramienta para la selección temprana de los reproductores.

Cuadro 2. Frecuencia de los alelos negativos para los factores Aa y Qa en diferentes razas para la selección de donantes de sangre para transfusiones sanguíneas.

RAZAS	Aa negativo	Qa negativo
PSC*	0.02	0.15
ARABE*	0.03	0.63
Cuarto de Milla*	0.26	0.68
Shetland ponies**	0.69	0.85

** Stormont, 1964. (29)

* Bowling, 1985. (3)

En equinos ya se han descrito varios ligamientos entre diferentes loci entre los cuales tenemos:

- Ligamiento entre Al, Gc y Es con tres colores de capa en equinos que pertenecen al grupo de ligamiento (GL) II, Sistema de GS K y PGD en el GL I, PHI y AIB en el GL IV y el Sistema de GS A está ligado al locus del complejo de Histocompatibilidad Mayor en de equinos (ELA) el que estaría en el GLIII (26).
- Dentro de las enfermedades que se han asociado con los MG. tenemos que las Pi están relacionadas con el enfisema pulmonar crónico de caballos (14).
- Con respecto a los MG asociados a características productivas tenemos que se ha descrito una asociación entre performance de "Trotadores suecos" y el locus de esterasa. Los resultados indicaron que la Es S está asociada a un efecto más positivo en el "performance" que la Es I, mientras que la Es F parece tener un efecto intermedio (1).

En otras especies, ya se han comprobado ligamientos entre microsatélites y enfermedades hereditarias, lo que ha mostrado que estos MG tienen un gran potencial para identificar genes (10). Los microsatélites se consideran ideales para realizar mapas de ligamiento génico debido a que son uno de los MG más polimórficos muy abundantes y que están distribuidos al azar en el genoma.

GLOSARIO

A S-PCR: Amplificación alelo específica, en la que se obtiene especificidad en la reacción de PCR debido al diseño de un oligonucleótido (primers), de modo que difieran parcialmente en el punto donde la secuencia entre alelos sea diferente. (25)

Coefficiente de consanguinidad para una población (F) es el exceso o defecto de heterocigotas en esa población. Según Kidd y col. (13) se calcula como:

$$F = \frac{(\text{Het}^* \text{ esperados} - \text{Het. observados})}{\text{Heterocigotas esperados.}}$$

*Het=heterocigotos.

Grupos sanguíneos: son los antígenos presentes en los eritrocitos detectados por métodos serológicos y que están determinados genéticamente. (18).

Índice de Heterocigosis: El índice de heterocigosis (H) se define como la frecuencia promedio esperada de individuos heterocigotas por locus en la población. (8).

Índice de homocigosis promedio: es la suma al cuadrado de las frecuencias genéticas de cada locus dividido por el número de loci (22).

Ligamiento: es la asociación física entre dos genes que resulta de estar presentes en un mismo cromosoma. (5).

Marcador genético: Es un alelo cuyo fenotipo es fácilmente reconocible y el cual puede ser usado para seguir la herencia del gen en cruzamientos genéticos. (5)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Una técnica que es capaz de generar múltiples copias de moléculas de ADN por amplificación enzimática de una secuencia de ADN determinado (5).

Pleiotropía: Gen individual que se expresa de varias maneras diferentes en el fenotipo, provocando el desarrollo de un número de características aparentemente distintas y no relacionadas entre sí. Un ejemplo de pleiotropía es cuando un gen que controla una característica de la sangre, influye también en un característica productiva (11).

Polimorfismo: Es la existencia de dos o más elementos genéticos contrastantes en una población a frecuencias mayores que las que pueden ser debidas a mutaciones recurrentes. Convencionalmente se refiere a un locus en el que la frecuencia del alelo más común es menor de 0.99. (27).

RAPD: Amplificación polimórfica al azar de ADN. Es una variación de la técnica de PCR en la que se utiliza un único primers corto e inespecífico (25).

RFLP: Polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción. Los RFLP se producen cuando se cortan ADN de diferentes individuos con enzimas de restricción (enzimas que reconocen secuencias específicas de ADN y lo cortan) y aparecen fragmentos de diferentes longitud debido a la aparición o desaparición de una base que elimine el sitio de reconocimiento de la enzima. (27).

Southern blot: Es una técnica utilizada para analizar los RFLP la que separa fragmentos de ADN en un gel de agarosa, que se transfiere a una membrana de nitrocelulosa y por hibridación a una sonda específica marcada se observa el patrón de tamaño de los fragmentos. (25).

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a aquellas entidades que financiaron la investigación de marcadores genéticos en equinos, así como también a las que permitieron, el desarrollo de las técnicas de tipificación sanguínea en el Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Veterinaria:

- Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).
- Programa para el desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), - Facultad de Veterinaria. Universidad de la República.
- Haras: Los Apamates.
- Servicio de Remonta del Ejército. División: Los Cerrillos.
- Laboratorio de grupos sanguíneos e Instituto de Zootecnia. Facultad de Veterinaria. Córdoba. España.
- Laboratorio de Inmunogenética, Universidad Federal de San Carlos SP. Brasil.
- Laboratorio de Inmunogenética. Sociedad Rural Argentina. Bs. As.
- Dpto. de Biofísica del Instituto de Investigación Biológicas Clemente Estable.
- Proyecto BID/CONICYT. PO22/94

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSSON, L.; ARNASON, TH. Y SANDBERG, K. (1987). Biochemical polymorphism in relation to performance in horses. *Theor. Appl. Genet.* 73:419-427.
2. BOTSTEIN, D. Y COL. (1980). *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-31.
3. BOWLING, A. T. (1985). *The use and efficacy of horse blood typing test. Equine Vete. Sci.* 5 (4):195-199.
4. BOWLING, ET. 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.
5. BROWN, T. A. (1992) *Genetics a molecular approach. 2nd de., London Chapman & Hall. P. 467.*
6. DE ANDRÉS CARAM D. F. (1982). Pura raza española de caballos: Comparación con otras razas mediante sus polimorfismos enzimáticos sanguíneos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba.
7. DOWDALL, R. C. (1985). Criando Criollos Bs.As. *Hemisferio Sur*, p. 409.
8. FERGUSON, A. (1980) *Biochemical systematics and evolution*, London, Blackie, p. 194.
9. GUERIN, G.; MERIAUX, J.C. (1986). La distribution des marqueurs sanguins dans les races equines. *Analyse sur un echantillon de Pur-sang, Trotteur Français et Selle Français. 12° Journal D'etude. CEREOPA.*
10. HOLMES, N. G. (1994). Microsatellite markers and the analysis of genetic disease. *Br. Vet. J.* 150:411-421.
11. JOHANSSON, Y., RENDEL, J. (1972). *Genetics and animal breeding*, San Francisco, W. H. Freeman, p. 489.
12. KELLY, L.; GAGLIARDI, R.; TRIAS, P.; BIAGETTI, R. Determinación de la eficiencia en el diagnóstico de paternidad mediante tipificación sanguínea en equinos Pura Sangre de Carrera. *En: VI Congreso Nacional de Veterinaria y Y Congreso de especialistas en Pequeños Animales. Nov. 1996. Montevideo.*
13. KIDD, K.K.; STONE, W. H.; CRIMELLA, C.; CARENZI, C.; CASATI, M.; ROGNONI G. (1980) *Immunogenetic and population genetic analyses of Iberian cattle. Anim Blood Grps. Biochem. Genet.* 11:21-38.
14. LUBAS, G. J., GUGLIUCCI, B., BRAEND, M., (1981). *Caractettrizzazioni de popolazioni equine mediante il polimorfismo ematico. Nota X, studio prliminare sulle varianti Pr nella raza Maremmana e Sanfratellan. Atti. SISVET, Gardone Riviera.* 35:585-586.
15. MARKLUND, S., ELLEGEN, H., ERILSSON, S., SANDBERG, K., ANDERSSON, L., (1994) *parentage ttesting and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. Anim. Genet.* 25:19-23.
16. MÉRIAUX, J. C. (1981) *Les groupes sanguins des chevaux et leurs utilisations pratique pour l'identification et le controle de filiation. P4 Chevall.* 127:533-548.
17. MÉRIAUX, J. C. (1992). *Controle de filiation et marqueurs sanguins chez les equidés. Rec. Méd. Vét. Spécial reproduction de Equidés.* 168 (11/12):969-972.
18. MITAT, J. (1985). *Inmunogenética Animal. Ciudad de La Habana, Ed. Científico Técnica, p. 530.*
19. NEIMAN-SOERENSEN, A. (1956). *Blood groups and bred structure as exemplified by threee Danish breeds. Acta Agr. Sacand.* 6:115.
20. ORAGH, L. (1988). *Les marqueurs génétiques sanguins chez le cheval Barbe. Magreb Veterinaire* 3-14:24-26.
21. PERAL, P., KIENAST, M., GORTARI, C. DIAZ, S., MADERNA, R., DULOOUT, F. N. (1995). *Marcadores genéticos en equinos: Sus aplicaciones. Analecta Vet. XV (1): 11-21.*
22. RENDEL, J. (1967). *Studies of blood groups and protein variants as a means of revealing similarities and differences between animal populations. Ahim. Breed, Abstr.* 35:371-383.
23. RODRIGUEZ, P. P. (1991). *Medicina Militar.* 47 (3):229-233.
24. RODRIGUEZ, P. P. (1992). *Medicina Militar.* 48 (1): 78-83.
25. SÁNCHEZ, A., MEDRANO, J. F. *Marcadores moleculares en sanidad y producción animal. Sanidad, Patología y producción animal, Pp 20-31.*
26. SANDBERG, K., ANDERSSON, L. (1974). *Genetic linkage in the horse. Y Linkage relationships among 15 blood marker loci. Hereditas* 100-208.
27. STANSFIELD, W. D. (1992). *Genética. 3a. ed. Mc.Graw-Hill Interamericana de Mexico. P. 574.*
28. STORMONT, C. (1979). *Positive Hour identification. Part. 2: Blood Typing. EquinPract.* 1(5):48-54.
29. STORMONT, C., SUZUKI, Y. (1964). *Genetic Systems of blood groups in Hourse. Genetics* 50:915-929.
30. WEBER, J. L. (1990). *Informativeness of human (dC-DA)n,(dG-dT)n Polymorphisms. Genomics* 7:524-530.
31. WONG, P. L., NICKEL, B. S., BOWLING, A. T., STEFFEY, E. P. (1986). *Clinical survey of antibodies against red blood cells in horses after homologous blood transfusion. Am. J. Vet. Res.* 47 (12):2566-2571.