

# Marcadores genéticos en el caballo: I Polimorfismo bioquímico sanguíneo (P.B.)

Pedro-Pablo Rodríguez Gallardo\*  
Pablo Aguilar Sánchez\*\*

## RESUMEN

En este artículo que tuvo como preámbulo de la serie, el titulado "Revisión histórica de los grupos sanguíneos en el hombre y en los équidos domésticos" (Medicina Militar Vol. 44, 2, 1988), se presenta el estado actual de las investigaciones en el campo de la Inmunogenética de équidos en España y en el extranjero, concretamente referidas al polimorfismo bioquímico sanguíneo.

Se argumentan las causas por las cuales se hacen indispensables la utilización de los marcadores genéticos para una correcta identificación individual y control de filiación, como garantías genealógicas en la expedición de documentos oficiales (Carta Genealógica), y en los métodos de Mejora genética equina. Se describe como se hizo necesaria la creación del Servicio de Hemotipos, a cargo de Veterinarios Militares, en el Instituto de Zootécnia (C.S.I.C.) Facultad de Veterinaria de Córdoba, exponiéndose la metodología que se lleva a cabo en este Centro.

Asimismo se revisan los conceptos de Marcador genético y Hemotipo y se estudia la nomenclatura del P.B. y su metodología.

## SUMMARY

In this article, that had as an introduction to the series, the one titled "Revisión histórica de los grupos sanguíneos en el hombre y en los équidos domésticos" (Medicina Militar Vol. 44, 2, 1988), a presentation is given of the present state of research in the field of equine Immunogenetics in Spain and abroad, with specific reference to sanguineous biochemical polymorphism.

There is a discussion of the causes that make the use of genetic marks essential for correct individual identification and control of relationships, as genealogical guarantees when issuing official documents (Stud Book), and the methods for improving equine genetics. A description is given of how the creation of the Haemotypes Service became necessary, run by Military Veterinarians, in the Institute of Zootechniques (C.S.I.C.), Veterinary Faculty of Córdoba, explaining the methodology carried out in this Center.

A review is also offered of the concepts of genetic Marking and Haemotyping, and a study is made of the nomenclature of the P.B. and its methodology.

## INTRODUCCION

El trabajo que presentamos constituye el primero de una serie que tuvo como preámbulo el publicado en esta revista (Vol. 44, 2, 1988) titulado "Revisión histórica de los grupos sanguíneos en el hombre y en los équidos domésticos". Pretendemos presentar la situación actual en el campo de la Inmunogenética de équidos en España, refiriéndonos en este artículo al polimorfismo bioquímico, para continuar en sucesivas publicaciones con grupos sanguíneos y aplicaciones de los marcadores genéticos.

Por otra parte hay un segundo aspecto, que para nosotros tiene un particular interés y es el haber sido Veterinarios Militares junto con investigadores del C.S.I.C. los primeros y únicos en España que se han ocupado de las investigaciones en este campo de la Inmunogenética equina, para dar solución a problemas concretos planteados en la

Cría Caballar nacional y que demandaban urgente solución. Todo ello ha sido posible en virtud de un Convenio de cooperación entre el C.S.I.C., Universidad de Córdoba y Ministerio de Defensa (Cría Caballar), mediante el cual se pone en funcionamiento un Servicio de diagnóstico de Hemotipos.

La cotización que adquieren en el mercado los équidos de razas selectas, hace que cada vez se pongan en juego más garantías acerca de la autenticidad del individuo objeto de la transacción comercial. Es decir, que sean rigurosamente ciertos los dos atributos que determinan el precio del sujeto: su INDIVIDUALIDAD (se paga por ese individuo y no por otro) y su GENEALOGIA. Ambos atributos constituyen, precisamente, los dos grandes bloques de información que nos proporciona la CARTA GENEALOGICA: Identificación individual-Reseña y Ascendencia.

Aún cuando la reseña, bien confeccionada realizada por el Veterinario, tiene indiscutible valor en la identificación, el nivel de exigencias de nuestro tiempo ha motivado su refuerzo con la implantación del tatuaje el cual al llevar aparejado no pocos problemas, en detrimento de su eficacia, no ha satisfecho las expectativas anheladas.

Por otra parte, los documentos que sirven de base para la elaboración de la

carta genealógica, hoy día ya no ofrecen la fiabilidad deseada, para asegurar la certeza de la ascendencia expresada en el documento.

Todos estos problemas han venido afectando a los países donde se explotan razas equinas selectas y la solución a los mismos fue común: la investigación del grupo sanguíneo (GS) y polimorfismo bioquímico (PB) del individuo que permitiría, por una parte, afinar aún mucho más en materia de identificación individual, añadiendo un carácter muy polimórfico a las cartas genealógicas, y por otro lado establecer un control de filiación confirmando o excluyendo paternidad, por cuanto estos caracteres de GS y PB están marcados genéticamente y se heredan.

Por todo ello, hoy día, los "stud-book" internacionales a través de su comité (ISBC), reconocen como una necesidad y exigencia, la determinación del GS y PB para los individuos de razas selectas como garantía de identidad individual y control de filiación.

Actualmente existen en el mundo 28 laboratorios (generalmente uno por país) que se dedican exclusivamente a estas tareas y que se encuentran agrupados en la Asociación Internacional para la Investigación de Grupos Sanguíneos Animales (ISABR), la cual controla la actuación de los laboratorios

\* Capitán Veterinario

\*\* Coronel Veterinario  
Servicio de Diagnóstico de Hemotipos  
Laboratorio de Grupos Sanguíneos  
Jefatura de Cría Caballar, Córdoba

mediante la realización de test de comparación.

Hasta el momento, comisionado por el Ministerio de Defensa para las correspondientes visitas, hemos tenido la oportunidad de obtener un buen conocimiento de algunos laboratorios europeos y americanos como el de Gif-Sur-Ivette (Francia) perteneciente al Centro Nacional de la Investigación Científica. El laboratorio de Jouy-en-Josas (Francia) del Centro Nacional de Investigaciones Zootécnicas (CNRZ) agrupado en el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INRA). El laboratorio de GS de la Asociación Central de Sociedades de Inseminación Artificial de Finlandia (Vantaa). Y por último en USA hemos podido conocer el laboratorio de grupos sanguíneos de la Universidad de Davis en California y el Laboratorio privado del Prof. Stormont de Woodland (California).

## MARCADORES GENÉTICOS

Hasta hace poco tiempo, y aún se continúa empleando, bajo la denominación de Grupo Sanguíneo, se acogía al conjunto de caracteres de la sangre que estaban determinados genéticamente y que se encontraban sometidos a una variación genética. Dentro de este término quedan englobados dos conceptos:

Diferencias estructurales antigénicas en la superficie del eritrocito (Grupo sanguíneo propiamente dicho) y Presentación de variantes (alelos) de enzimas y proteínas internas del eritrocito y del plasma (Polimorfismo Bioquímico Sanguíneo).

Esta posibilidad de que se presenten diferencias de estructuras en la superficie del eritrocito, de unos individuos a otros (polimorfismo), o que puedan existir en un individuo determinada variante de una proteína que no figura en otro (polimorfismo bioquímico), todo ello marcado genéticamente codificado en el DNA, es lo que se denomina **Polimorfismo Genético**. Fenómeno directamente relacionado con la individualidad químico-biológica del sujeto, que afecta no solo a la sangre (polimorfismo genético sanguíneo = GS + PB + ...) sino a otros líquidos y estructuras orgánicas, así como a moléculas complejas como el DNA.

Desde un punto de vista más concreto, siguiendo a Cavalli-Sforza (1971), se puede definir el polimorfismo genético como la existencia, dentro de una población, de dos o más alelos en un locus cada uno con una frecuencia apreciable.

A la vista de lo expuesto, y en base al polimorfismo, podemos vislumbrar que estamos frente a un buen sistema de identificación individual. Si además los caracteres de GS y PB son genéticos,

podremos analizar cómo se heredan de padres a hijos, ofreciéndonos la posibilidad de establecer un control de filiación.

Como quiera que estos caracteres de GS y PB están codificados en el DNA, presentan las características inherentes al material genético, es decir se trata de caracteres constantes, permanentes, indelebles, ajenos a las acciones del medio ambiente, presentes en el individuo a lo largo de toda su vida, incluso, detectables "in utero" (Kaminski y col. 1974). En definitiva son caracteres que **marcan** de por vida al individuo, de aquí su denominación de **Marcadores Genéticos**.

A la suma de marcadores genéticos sanguíneos empleados en la tipificación de un individuo es a lo que se denomina **Hemotipo**. Término acuñado por Kaminski no hace mucho tiempo.

## POLIMORFISMO BIOQUÍMICO (PB)

### 1. Revisión bibliográfica

Para Andrés Cara (1985), el PB se puede definir como el conjunto de variantes de las proteínas (enzimáticas o no) del plasma o suero, de los eritrocitos o leucocitos, determinadas genéticamente y típicamente puestas de manifiesto mediante la electroforesis.

Como ya hemos indicado anteriormente las variantes electroforéticas, no son más que algunos aspectos del polimorfismo biológico que permite caracterizar individuos genéticamente diferentes. El polimorfismo bioquímico abarca todos los polimorfismos que tienen una significación bioquímica. En la práctica este término designa restrictivamente, al polimorfismo puesto en evidencia únicamente por las técnicas electroforéticas, de aquí su denominación también como polimorfismo electroforético. Mediante el empleo de la electroforesis en gel de almidón se describió en 1955 por parte de Smithies, el primer caso de polimorfismo referido a la haptoglobina humana.

Cabannes y Serain en 1955, fueron los primeros investigadores que demostraron, mediante electroforesis sobre papel, el polimorfismo de una proteína de caballo que fue la hemoglobina. Pero no es hasta 1964 cuando se ponen a punto las técnicas electroforéticas e histoquímicas, utilizadas para la determinación de los sistemas de proteínas y enzimas polimórficos del suero y del hemolizado.

Sin necesidad de detallar una secuencia de referencias, que describen los avances conseguidos en la mejora de la electroforesis, desde que en 1955 se empleó por primera vez para el estudio del PB, la explotación de dicha técnica hasta hoy día, ha sido continua en la línea de incrementar su sensibilidad y poder de discriminación.

De las técnicas que emplean almidón como soporte, se está pasando a la utilización de la poli(acrilamida). De la emigración unidimensional, se ha evo-

lucionado a la electroforesis bidimensional. Y por último, entre otros avances, de la utilización del pH constante se ha pasado al empleo de las técnicas de isoelectroenfoque.

A continuación hacemos algunas referencias a las aportaciones del PB electroforético, al campo de la identificación individual con el descubrimiento de nuevos sistemas polimórficos y nuevas variantes, o al campo de la Genética de Poblaciones y Genética Evolutiva.

En 1964 Braend y Stormont estudian los sistemas de hemoglobinas y transferrinas en el caballo.

Posteriormente GAHNE (1966) amplía el número de sistemas a estudiar con las albúminas, prealbúminas y esterasas. En 1968 Gahne junto con Bengtsson y Rendel amplían estudios en esta línea.

En estos últimos años ha sido extraordinaria la producción científica relativa al estudio de los sistemas. A continuación exponemos sólo algunos detalles del acontecer científico reciente en estas investigaciones.

Baer en 1968 investiga el polimorfismo de las transferrinas y sus aplicaciones zootécnicas. Poco a poco se va completando el estudio de este sistema con extraordinarias aportaciones como las de Bowling (1974) acerca de un nuevo fenotipo o recientemente la de Andrés y Kaminski (1985) con la propuesta de la variante J como un nuevo alelo del sistema de transferrinas.

El sistema de la proteína inhibidora o prealbúmina, por su complejidad, ha sido un continuo reto para los investigadores, desde que en 1977 Ek identificara las proteínas de este sistema en suero de caballo. Un año después Braend realiza un estudio genético del sistema de prealbúminas en el caballo.

Scott (1977-78) realiza interesantes estudios para la interpretación del sistema de prealbúminas y en 1980 Bell y Pollit emplean la poli(acrilamida) para la detección de este sistema.

Desde 1970 Sandberg y Bengtsson investigan en caballos suecos sistemas enzimáticos eritrocitarios como la fosfoglucomutasa (PGM) y la 6-fosfogluconatodeshidrogenasa (6-PGD).

El sistema GC ya fue estudiado por Juneja en 1978 y con bastante anterioridad, en 1967, Braend investiga las variaciones genéticas de la hemoglobina del caballo, sistema que fue de los primeros en estudiarse.

En cuanto a los estudios de genética de poblaciones y evolutiva, tomando como referencia el PB, han sido numerosísimos los trabajos publicados. Particularmente tenemos que citar las valiosas investigaciones de Kaminski sobre el conocimiento genético de las razas equinas explotadas en Francia, o los estudios de Bouquet en Bélgica, Sandberg en Suecia, Bowling en USA, etc.

Con respecto a la evolución de las técnicas, Fisher y Scott desde 1978 emplean la técnica de isoelectroenfoque para la detección de esterasas y en 1984 Juneja aplica la electroforesis

**Marcadores genéticos en el caballo:**  
**I Polimorfismo bioquímico sanguíneo (P.B.)**

bidimensional al estudio del polimorfismo de la ceruloplasmina.

En España la evolución de la investigación del PB, se desarrolla de forma paralela a los GS. Hacia los años setenta comienzan las primeras investigaciones del PB sobre ovinos a cargo de los Drs. Rodero y Garzón en la Facultad de Veterinaria de Córdoba. Pero no es hasta 1978 cuando se aborda el estudio del PB equino, concretamente del caballo español, por parte del Dr. Andrés Cara. Este trabajo de tesis doctoral junto con los del Dr. Aguilar sobre GS han fundamentado nuestro Servicio de Diagnóstico de Hemotipos.

**2. Nomenclatura del PB**

El plasma sanguíneo y los eritrocitos contienen un número elevado de proteínas con sus funciones diversas en el organismo. Pero no todas tienen la cualidad de ser polimórficas, es decir, de presentar variantes electroforéticas.

La ISABR, como se puede observar en la Fig. 1, reconoce 15 sistemas de proteínas que presentan PB con un total de 63 variantes electroforéticas. Cada proteína está codificada por un gen de estructura y cada variante electroforética está bajo el control de una forma alélica de su gen de estructura, constituyendo una serie multialélica de genes codominantes que controlan las variantes electroforéticas. En virtud de este tipo de herencia hay una correspondencia de identidad entre fenotipo y genotipo.

Las diferencias entre las formas alélicas de una proteína, estriban en algunos tripletes de bases que codifican unos pocos aminoácidos distintos, modificándose el balance eléctrico de la proteína. Esta sutil diferencia de carga eléctrica para cada variante, es detectada mediante la aplicación de la electroforesis, ocupando dichas variantes, según su carga, una posición más avanzada o retrasada en un campo eléctrico al que se las sometiera.

**3. Análisis del PB: electroforesis**

El método para realizar el estudio del PB del suero, es la electroforesis.

**3.1. Factores que intervienen en la electroforesis**

Fundamentalmente son los siguientes:

a) El gel de poliacrilamida o almidón que constituye el soporte sobre el cual actuará el campo eléctrico y se desarrollará la electroforesis.

Es importante el tamaño de poro a definir, pues ello constituye un elemento

SISTEMA	LOCUS	ALELOS RECONOCIDOS
Albúmina .....	Al	A B I
Fostatasa ácida .....	AP	F S
Anhidrasa carbónica .....	CA	F I L O S
Catalasa .....	Cat	F S
NADH-diaforasa .....	Dia	F S
Esterasa .....	Es	F G H I O S
Peptidasa A .....	Pep A	F S
Proteína ligada vitamina D .....	GC	F S
Hemoglobina .....	Hb	A AII B I BII
Postalbúmina .....	Xk	F K S
6-fosfogluconato deshidrogenasa	PGD	D F S
Fosfoglucomutasa .....	PGM	F S V
Fosfohexosa isomerasa .....	PHI	F I S
Proteína inhibidora de proteasas (Prealbúmina)	Pi	F G I K L N P Q R S T U W V Z
Transferrina .....	Tf	D (D <sub>1</sub> D <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ) F, F <sub>2</sub> (F <sub>3</sub> ) (G) H (H <sub>1</sub> H <sub>2</sub> ) J M O R

( ) variantes próximas a ser reconocidas por la ISABR.

Figura 1.—Nomenclatura del polimorfismo bioquímico publicada por la ISABR para el test de comparación de 1987.

selectivo, en función del tamaño de las proteínas a separar, unas quedarán retenidas y otras emigrarán.

También el pH del gel, en relación con el punto isoelectrico de las proteínas a separar, deciden la emigración y su sentido.

b) En cuanto a la proteína son factores influyentes, su naturaleza globular o fibrosa, su peso molecular, tamaño o volumen y estructura. Todos estos factores junto con la carga eléctrica, determinan que las proteínas más pesadas sean más lentas en la emigración que

las más ligeras. Sin embargo para la discriminación de variante, dentro de un sistema, prácticamente influye sólo la carga eléctrica distinta de las variantes (Fig. 2).

La propia estructura de la proteína influye en la imagen de su fenotipo (electromorfo) en el gel, habiendo fenotipos constituidos por una sola banda o por varias.

c) Parámetros eléctricos: intensidad, potencia y voltaje. Serán diferentes en función de las proteínas a discriminar, de acuerdo con la técnica a aplicar.

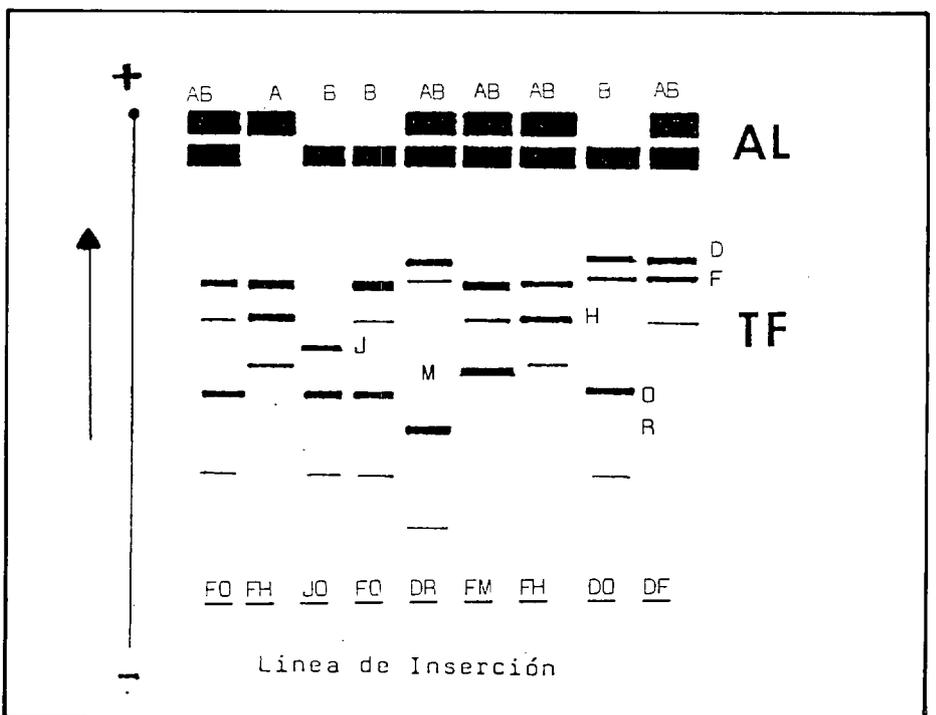


Figura 2.—Diagrama de los fenotipos de transferrina (Tf) y albúmina (Al) en nueve muestras de suero.

### 3.2. Protocolo para análisis del PB

1. Preparación de geles de almidón o poliacrilamida a un pH concreto en función de las proteínas a discernir.

2. Elaboración de los tampones de vasos (cátodo-ánodo).

3. Colocación de las muestras del suero en el gel.

4. Aplicación de la electroforesis en frío.

5. Tinción y fijación de los geles.

6. Lectura e interpretación genética (Fig. 2): por razones de codominancia el fenotipo FO o AB etc. le corresponde el genotipo F/O o A/B, etc. procediendo cada alelo de un progenitor.

### 3.3. Determinaciones que se realizan en el Servicio de Diagnóstico de Hemotipos

A lo largo de estos cuatro últimos años, se ha ido ampliando el número de sistemas bioquímicos a determinar, hasta el momento presente en que el diagnóstico abarca nueve sistemas, situándose de esta forma nuestro laboratorio, entre los países de cabeza en relación con el número de sistemas empleados para la tipificación.

Tener montadas todas las técnicas relativas a los 15 sistemas reconocidos puede resultar antieconómico, cuando con menos se pueden obtener adecuadas garantías en los resultados, lo que no debe faltar es el control de los sistemas de transferrinas y prealbúminas, que son dos proteínas que tienen gran valor en el control de filiación al ser muy polimórficas.

a) **Sobre suero sanguíneo** se controlan los siguientes sistemas:

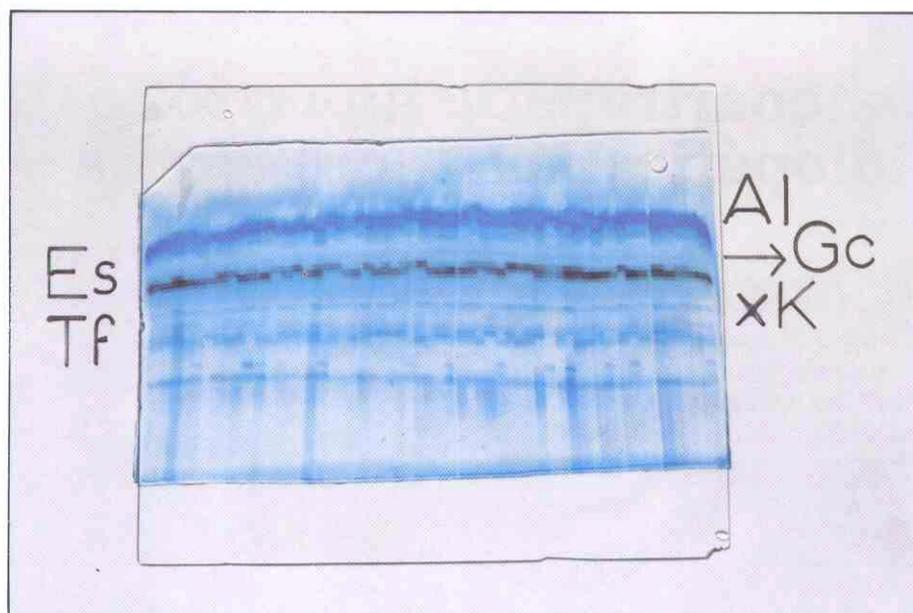


Figura 3.—Gel de poliacrilamida pH alcalino.

#### 1. Mediante electroforesis en gel de almidón pH ácido:

Sistema de Esterasas ácidas (Es)  
Sistema de Prealbúminas (Pi): se trata de un sistema muy complejo que pocos laboratorios controlan.

#### 2. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) pH alcalino (Fig. 3).

Sistema de Albúminas (AL)  
Sistema GC  
Sistema de Esterasas alcalinas (Es)  
Sistema de Postalbúminas (Xk)  
Sistema de Transferrinas (Tf)

#### b) **Sobre el hemolizado:** enzimas eritrocitarias determinadas sobre almidón:

Sistema 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD)  
Sistema fosfoglucomutasa (PGM)

#### Sistema fosfo hexosa isomerasa (PHI).

Acometemos en el momento presente un plan de ampliación de técnicas, encaminado a obtener mayor resolución en algunos sistemas y obtener mayor sensibilidad en la discriminación de variante. En cuanto al primer aspecto, tratamos de poner a punto la técnica de determinación de prealbúminas en gel de poliacrilamida a pH ácido, técnica que es dominada por escaso número de laboratorios.

Relativo al segundo aspecto, se están poniendo a punto las técnicas de isoelectroenfoque como metodología más sofisticada y sensible en la determinación de variantes, particularmente interesante en la descripción de variantes nuevas o poco conocidas, como base de trabajos de investigación.

## BIBLIOGRAFIA

- ANDRES, D.F. de: *Pura Raza Española de caballos: comparación con otras razas mediante sus polimorfismos enzimáticos sanguíneos*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 1982.
- ANDRES, D.F. de: *Memoria oposiciones Colaborador Científico. C.S.I.C. Instituto de Zootecnia*. Córdoba 1985.
- ANDRES, D.F. de and KAMINSKI, M.: *The inheritance of transferrin J in Andalusian horse breed*. ISABR. XX<sup>th</sup> Conf. Abstract, pag. 57, Helsinki, Finland. 1986.
- BAER, A.: *Le polymorphisme biochimique des transferrines chez le cheval. Quelques aspects zootechniques, biochimiques et immunologiques*. These Doct. vét. Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Berne 1968.
- BOWLING TROMMERSHAUSEN, A.: *A new transferrin phenotype in horses*. Anim. Blood Grps. biochem. Genet., 5, suppl. 1, pg. 25. 1974.
- BRAEND, M.: *Genetic variation of horse hemoglobin*. Hereditas, 58, págs. 385-392. 1967.
- BRAEND, M. and STORMONT, C.: *Studies on hemoglobin and transferrin types of horses*. Nord. Vet. Med., 16, págs. 31-37. 1964.
- CABANNES, R. et SERAIN, C.: *Etude électrophorétique des hémoglobines des mammifères domestiques d'Algérie*. C.R. Soc. Bio., 149, págs. 1.193-1.197. 1955.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. and BODMER, W.F.: *The Genetics of Human Populations*. W.H. Freeman and Co., San Francisco. U.S.A. 1971.
- FISHER, R.A. and SCOTT, A.M.: *Isoelectric focusing of horse serum esterase isozyme and detection of new phenotypes*. Anim. Blood Grps. biochem. Genet., 9, págs. 207-213. 1978.
- GAHNE, B.: *Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumins, prealbumins and plasma esterases of horses*. Genetics, 53, págs. 126-135. 1966.
- INTERNATIONAL SOCIETY FOR ANIMAL BLOOD GROUP RESEARCH (I.S.A.B.R.): *Horse blood typing Nomenclature for 1987 I.S.A.B.R. horse Comparison Test*. Comunicación interna de la I.S.A.B.R. 1987.
- JUNEJA, R.K.; GAHNE, B. and SANDBERG, K.: *Genetic polymorphism of the vitamin D binding protein and another pos-albumin protein in horse serum*. Anim. Blood Grps. biochem. Genet., 9, págs. 29-36. 1978.
- JUNEJA, R.K.; ANDERSSON, L.; SANDBERG, K.; GAHNE, B.; ADALSTEINSSON, S. and GUNNARSSON, E.: *Two-dimensional electrophoresis of horse serum proteins: genetic polymorphism of ceruloplasmin and two other serum proteins*. Anim. Blood Grps. biochem. Genet., 15, págs. 237-250. 1984.
- KAMINSKI, M.; BOUQUET, Y.; VAN de WEGHE, A. et PODLIACHOUK, L.: *Ontogenèse des marqueurs génétiques sanguins chez le cheval*. Ann. Genet. Sel. Anim., 6, págs. 195-210. 1974.
- SANDBERG, K. and BENGTSSON, S.: *Polymorphism of hemoglobin and 6-phospho-gluconate dehydrogenase in horse erythrocytes*. Proc. XI<sup>th</sup> Europ. Conf. Anim. Blood Grps. biochem. Polymorphism. Págs. 527-531, Budapest 1970.
- SCOTT, A.M.: *Prealbumin: the single most useful system in thoroughbred horse blood typing*. Anim. Blood Grps. biochem. Genet., 8, suppl. 1, pag. 19. 1977.
- SCOTT, A.M.: *Prealbumins in the arab-horse: a model for a better interpretation of the system*. ISABR XV<sup>th</sup> Conf. Proc. IV, págs. 180-190, Leningrado. 1978.
- SMITHIES, O.: *Zone Electrophoresis in Starch Gels: group variations in the serum proteins of normal human adults*. Biochem. J., 61, págs. 629-641. 1955.