

## La investigación del ADN en el Laboratorio de Grupos Sanguíneos de Cría Caballar (Córdoba)

P.P. Rodríguez-Gallardo<sup>1</sup>, J.L. Vega-Pla<sup>2</sup>

### RESUMEN

En la actualidad los laboratorios de genética equina distribuidos por el mundo, dedicados a la investigación biológica de la paternidad (35 aproximadamente), están implantando en su repertorio analítico las técnicas que detectan el polimorfismo genético del ADN como complemento de las técnicas clásicas para incrementar la eficacia de los dictámenes. Todo ello, como sucede en veterinaria, supeditado equilibradamente con el precio del animal y con arreglo a las pautas que marca la política de los libros genealógicos. Se describen sucintamente los objetivos y función del Laboratorio de Grupos Sanguíneos de Córdoba (Servicio de Cría Caballar), los conceptos de marcador genético, hemotipo y microsatélite. Su evolución, situación actual e incardinación internacional referente a la nueva tecnología ADN como laboratorio oficial de España en este ámbito, encuadrado en la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) que va marcando directrices científicas y requerimientos técnicos al efecto.

**PALABRAS CLAVE:** Caballo - ADN - Marcadores genéticos - Grupos sanguíneos - Polimorfismo bioquímico - Microsatélites  
*Med Mil (Esp) 1997;53 (4): 320-325*

### INTRODUCCIÓN

En torno a los años 70 el caballo va tomando un inusitado interés como individuo, fruto de su empleo cada vez más frecuente en diferentes disciplinas deportivas y de su utilización como elemento recreativo al alcance del gran público, todo ello como consecuencia del incremento de nivel de vida experimentado en amplias capas de la sociedad. Por otra parte, y como consecuencia de la actividad investigadora desarrollada en décadas anteriores, se empiezan a consolidar, en diversas universidades y centros de investigación públicos europeos y americanos, laboratorios de genética que a través del estudio de los grupos sanguíneos (GS) y el polimorfismo bioquímico (PB) de las proteínas refuerzan la identificación individual y la filiación que es aportada en los documentos genealógicos de los caballos, puesto que ambos extremos no sólo tienen un enorme interés en las transacciones comerciales sino además en la fiabilidad de los libros genealógicos que constituyen un instrumento fundamental para la mejora genética de las razas.

A principios de los años 80 concurren en España una serie de circunstancias que van a motivar que por primera vez se aborden en nuestro país investigaciones en el campo de la inmu-

nogenética de équidos en el seno de la Unidad de Genética de la Facultad de Veterinaria de Córdoba y a cargo de veterinarios militares y civiles. Al mismo tiempo, el Servicio de Cría Caballar, que controla los libros genealógicos de las razas selectas explotadas en España, siente cada vez más la necesidad de realizar controles de filiación, a través de marcadores genéticos, al efectivo caballar que controla soportando una presión importante por parte de los países hacia donde se exportan y de donde se importan caballos, y que exigen la determinación del hemotipo (GS y PB). Ante esta situación y en este primer momento la Jefatura de Cría Caballar se ve obligada a solicitar los servicios de un laboratorio extranjero para poder cumplir estas exigencias.

En este contexto, y guiados siempre por el principio de la economía de medios, se establece en 1984 un Convenio de Cooperación entre el Ministerio de Defensa (Servicio de Cría Caballar) y la Universidad de Córdoba (Unidad de Genética de la Facultad de Veterinaria), a fin de poner en funcionamiento un laboratorio de grupos sanguíneos que pueda resolver los problemas que en este tema tenía planteados la cría caballar española. Nace por tanto este centro en el seno de la Universidad encuadrado en la Administración Militar y hoy día sustentado por ella pero manteniendo, necesariamente por el contenido de sus trabajos, su imprescindible vocación y vinculación universitaria, materializada concretamente en la Unidad de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba. No obstante haber conseguido a satisfacción este objetivo, el Convenio abordaba otras cuestiones relativas a la formación de veterinarios civiles y militares que condujeron a la creación de una nueva especialidad para Veterinaria Militar denominada "Genética y Reproducción", que constituyó el germen del actual "Máster en Equinotecnia", primera titulación de esta naturaleza

<sup>1</sup> Cte.San.Vet

<sup>2</sup> Cap.San.Vet.

Del Laboratorio de Grupos Sanguíneos. Servicio de Cría Caballar. Córdoba

**Dirección para la correspondencia:** Dr. D. Pedro Pablo Rodríguez-Gallardo. Apartado Oficial Sucursal nº 2. 14071 Córdoba

Fecha de recepción del manuscrito: 29 de septiembre de 1997

Fecha de aceptación del manuscrito: 22 de octubre de 1997

## El ADN en el Laboratorio de Grupos Sanguíneos

implantada en la Universidad de Córdoba, y de la que hoy se imparte su novena edición.

Transcurridos trece años desde la creación del Laboratorio de Grupos Sanguíneos, se han tipificado hasta el momento 55.000 individuos de ambos sexos y diversas razas explotadas en España, pero fundamentalmente pertenecientes a la Pura Raza Española de caballos. Todo ello ha sido llevado a cabo primordialmente en los últimos años, ya que los primeros estuvieron dedicados a poner a punto todas las técnicas electroforéticas para detectar el polimorfismo bioquímico de las proteínas (10 sistemas genéticos) y las serológicas de hemaglutinación y hemólisis, así como la obtención de la batería de sueros reactivos anti-factor de grupo sanguíneo (7 sistemas genéticos) empleando inmunizaciones donante-receptor de grandes efectivos. Por otra parte se ha ido atendiendo a todo el programa de control de filiación dispuesto anualmente por el Servicio de Cría Caballar para sondear el efectivo de nacimientos anuales, efectuándose los correspondientes estudios de investigación biológica de la paternidad.

La contrastación de resultados a nivel internacional se lleva a cabo periódicamente a través de un test de comparación, a resolver por todos los laboratorios participantes y que está organizado por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) a la que pertenece, como miembro institucional, el Laboratorio de Grupos Sanguíneos.

### CARACTERES GENÉTICOS PARA IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE PATERNIDAD: MARCADORES GENÉTICOS

Las asociaciones de criadores de caballos de razas puras, que empiezan a aparecer a partir de finales del siglo XIX, tienen como objetivo la definición de modelos raciales teóricos y el diseño de planes de selección animal que permitan conseguir dichos modelos. Para ello es indispensable la valoración y selección de los reproductores más adecuados, teniendo plena seguridad de la identificación y conocimiento de la genealogía de cada individuo. Inicialmente los métodos de identificación y selección se han basado en unos pocos caracteres morfológicos y funcionales, pero cada vez era mayor la necesidad de establecer unos parámetros más objetivos y exactos, que contribuyesen no sólo a disminuir los errores y, por qué no, los fraudes en las asignaciones de paternidades, sino también a conocer mejor la estructura genética de las poblaciones y facilitar la elaboración de planes de selección animal.

En la década de los años 60, ciencias como Genética, Bioquímica e Inmunología, ofrecen la posibilidad de estudiar unas estructuras variables de unos individuos a otros que no han sido objeto de la selección dirigida por el hombre. Se trata de proteínas que presentan, al menos, dos variantes detectables. La identificación de las variantes paterna y materna de una misma proteína en distintos individuos, permite, en muchas ocasiones, diferenciarlos unos de otros y controlar la filiación de los mismos. A estas proteínas útiles en las pruebas de identificación se las denomina con el término de **marcadores genéticos**.

Estos marcadores deben cumplir algunos requisitos: 1) ser estables a lo largo de la vida de un individuo, 2) estar controla-

dos por un solo gen o *locus* genético, y 3) las técnicas empleadas para su caracterización deben ser científicamente probadas, reproducibles y precisas.

La variabilidad o polimorfismo de estos marcadores genéticos se estudia clásicamente sobre muestras de sangre y mediante métodos inmunológicos (reacciones antígeno-anticuerpo) o bioquímicos (electroforesis).

Ya en esta misma década de los 60 comienzan a aparecer laboratorios de identificación y control de paternidad equinos en diferentes países. El objetivo de dichos laboratorios es detectar las variantes presentes en los marcadores de un ejemplar y, a continuación, comprobar que son compatibles con las que presentan los supuestos progenitores, apoyando de manera científica a las asociaciones de criadores en el control de los libros de registro de genealogías. En la actualidad, dentro del ámbito del caballo, existen unos 35 laboratorios responsables de la tipificación genética equina y han de cumplir unos requisitos mínimos para que sus resultados sean admitidos internacionalmente: 1) deben ser miembros de la ISAG (International Society of Animal Genetics), y 2) deben someterse a las pruebas periódicas de contrastación de resultados que organiza dicha sociedad.

Se designa con el término de **hemotipo** a la relación de las variantes paternas y maternas que exhibe el individuo para cada uno de los marcadores estudiados. Este término se ha forjado en el ámbito de la medicina humana, aunque tiene una aplicación general en otras especies animales.

La descripción del polimorfismo sanguíneo clásico, es decir grupos sanguíneos y polimorfismo bioquímico de las proteínas, se remonta 40 años atrás en que L. Podliachouk describe en 1957 las primeras aglutininas (1). Posteriormente, los progresos en este terreno no han cesado, extendiéndose a los sistemas electroforéticos y son actualmente de aplicación rutinaria en la tipificación de los efectivos para el control de filiación que se practica a requerimiento de los libros genealógicos. Ulteriormente, la gran y tediosa dificultad de producir sueros reactivos de grupos sanguíneos ha orientado las investigaciones hacia otros marcadores genéticos. En esta línea se ha abordado el estudio de los antígenos tisulares controlados por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (2) que presentan la ventaja de ser muy polimórficos, pero imperativos técnicos y la propia complejidad del sistema no ha permitido el desarrollo esperado para la tipificación de un elevado número de muestras. Igualmente, la producción de anticuerpos monoclonales específicos de antígenos de glóbulos rojos, ha permitido obtener algunos reactivos empleados en la tipificación normalizada, pero que no han venido a simplificar la tarea de los laboratorios. Únicamente la puesta en evidencia del polimorfismo de la alfa-1-antitripsina (3) se ha revelado eficaz en los análisis normalizados, aunque algunos de sus alelos son de interpretación delicada. Todas estas sucesivas determinaciones que se han ido aplicando, están encaminadas a lograr una mayor exactitud en la identificación individual y a obtener una eficacia en torno al 100% en términos de Probabilidad de Exclusión (PE) que permita aseverar una paternidad con la misma seguridad (100%) con que se excluye.

Estos marcadores genéticos equinos también son útiles para el establecimiento de relaciones entre diferentes razas (4,5). Por el contrario, han tenido poca influencia en los métodos de selección de reproductores, por no haberse podido establecer clara-

mente relaciones directas entre caracteres de producción y variantes determinadas.

## LA NUEVA TECNOLOGÍA DEL ADN

En la actualidad el empleo de los sistemas de grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos es el procedimiento internacionalmente reconocido para investigar la paternidad en caballos, aunque ya se han ido proponiendo varias técnicas para estudiar la variabilidad que ofrece el ADN.

## POLIMORFISMO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

Consiste en realizar una fragmentación del ADN y una electroforesis para separar los fragmentos generados, en función de su tamaño; a continuación se emplean sondas que se unen a fragmentos determinados y dan lugar a un patrón de bandas muy característico que se ha denominado clásicamente como *huella genética* (6). Aunque es una técnica eficaz para realizar pruebas de paternidad, su complejidad, su baja repetibilidad y la necesidad de un ADN en condiciones óptimas, han relegado su empleo a circunstancias excepcionales dentro del mundo equino.

## POLIMORFISMO DEL ADN MITOCONDRIAL

Se trata del estudio del ADN que se encuentra dentro de las mitocondrias. Esta técnica es útil solamente cuando se necesitan referencias de la línea materna, pues el espermatozoide no aporta ninguna mitocondria a la célula huevo, por lo que el material genético que posee la misma siempre procede de la madre (7).

## POLIMORFISMO DE LOS MICROSATÉLITES

Recientes estudios sobre el ADN (8-10) permitieron descubrir en el genoma humano unas secuencias muy peculiares que fueron denominadas microsatélites. Se trata de repeticiones en tándem de motivos simples (ejemplo  $[TG]_n$  donde  $10 < n < 30$ ). La función que tienen, así como su mecanismo de acción, son poco conocidos. El interés de emplear los microsatélites como marcadores genéticos descansa sobre una serie de características que poseen:

1. Son muy frecuentes y están repartidos por todo el ADN y, a menudo, presentando un alto grado de polimorfismo en cuanto al número de repeticiones de la secuencia (11).
2. El modelo de herencia es mendeliano y los alelos detectados presentan codominancia.
3. Se necesitan cantidades muy pequeñas de material biológico para la determinación de las variantes alélicas, incluso aunque el ADN esté bastante degradado, lo que permite el estudio de muestras muy antiguas.
4. Las técnicas empleadas para la detección de la variabilidad son muy simples en comparación con otras técnicas de investigación del polimorfismo del ADN.

Estas características han llevado a considerar a los microsatélites como los marcadores genéticos de elección para conseguir, no sólo la identificación y control de la genealogía, sino también una mejor apreciación y caracterización de la diversidad genética de las razas (12). En la actualidad se han descrito ya casi un centenar de microsatélites equinos.

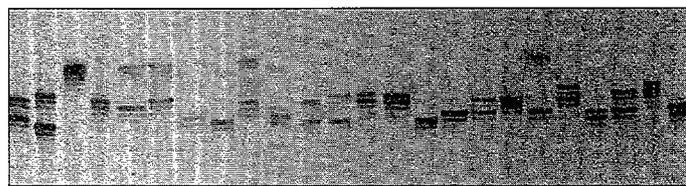
La variación genética de los microsatélites se detecta utilizando una técnica denominada **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** (13,14) y una electroforesis de los productos resultantes. El material de partida es generalmente sangre aunque podría emplearse también pelo y otros tejidos biológicos, necesitándose muy poca cantidad de material de partida. Con esta reacción se copia varios millones de veces una zona muy concreta donde se halla la secuencia con el microsatélite y, mediante técnicas de electroforesis, se analizan las variaciones en longitud de los fragmentos de ADN generados en esta amplificación (figura 1). Este proceso es fácilmente automatizable y la electroforesis puede ser llevada a cabo mediante el empleo de secuenciadores automáticos que ofrecen otras facilidades adicionales para la identificación de las variantes y su procesamiento informático.

Estas técnicas basadas en la caracterización de variantes de microsatélites están teniendo un gran empuje por varias razones:

1. A medio plazo serán más económicas.
2. Cualquier laboratorio que quiera empezar a llevarlas a cabo sólo necesita una infraestructura adecuada, no dependiendo de un plantel de caballos para realizar las inmunizaciones y obtención de sueros reactivos.
3. Son más sencillas de desarrollar, ya que se emplea siempre el mismo protocolo y equipamiento, independientemente del marcador que se estudie.
4. Si bien la sangre es el material de elección para obtener el ADN de un individuo, en casos excepcionales se podría obtener a partir de pelo, huesos y otros tejidos biológicos.

## EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ADN DENTRO DE LA ISAG

La Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) se constituye como un organismo que difunde, coordina y supervisa la aplicación de las nuevas tecnologías y avances científicos relacionados con el campo de la genética animal. En este senti-



**Figura 1.** Variantes alélicas del microsatélite HMS2 detectadas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante, teñido con nitrato de plata, de los productos obtenidos con una reacción en cadena de la polimerasa a partir de 24 muestras de ADN equino.

## El ADN en el Laboratorio de Grupos Sanguíneos

do, se está impulsando desde hace varios años el estudio de técnicas de ADN y su posible aplicación dentro del mundo del caballo.

En el año 1988 se establece un grupo de trabajo, que consta inicialmente de cinco investigadores de diferentes laboratorios, orientado a realizar una primera prospección sobre las técnicas de ADN enfocadas a las pruebas de paternidad equinas.

Estos investigadores proponen una estrategia a desarrollar en dos fases: 1) realizar estudios del ADN mediante la técnica del análisis de los fragmentos de restricción; 2) construcción de genotecas ("bibliotecas" de genes) para encontrar marcadores específicos de variantes.

La estrategia diseñada y la propuesta que sugieren se exponen en una reunión de trabajo de la sección de caballos dentro de la XXI Conferencia Internacional de Grupos Sanguíneos y Genética Bioquímica de los Animales celebrada en Turín (Italia) en julio de 1988.

Con motivo de la realización del segundo test de comparación de resultados del caballo Pura Sangre Inglés, se lleva a cabo una reunión en Brisbane (Australia) en julio de 1989 en la XXII Conferencia Internacional de Genética Animal. En el orden del día se hace mención a las técnicas de ADN, en concreto al análisis de fragmentos de restricción:

1. Se reconoce la potencialidad de esta técnica en lo referente a identificación y control de paternidad equinos.

2. Se pone de manifiesto la dificultad de emplearla de manera ordinaria en la tipificación de grandes poblaciones de caballos debido a la complejidad de la técnica.

3. Se advierte que ya hay entidades comerciales dispuestas a realizar este tipo de pruebas y que se deben tener las máximas reservas pues las técnicas aún no están bien establecidas.

4. Se plantea el problema de la transición de las técnicas en vigor a las propias del ADN, proponiendo un periodo de prueba de varios años y la necesidad de estandarizar los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios.

5. Se hace referencia al elevado coste de dicha tecnología.

En 1992 se encuentran las primeras seis secuencias de ADN conteniendo microsatélites (15), abriendo las puertas a la utilización de este tipo de marcadores.

Durante el XXIII Congreso Internacional de Genética Animal, celebrado en agosto de 1992 en Interlaken (Suiza), se confirma el importante papel que ha de tener la ISAG en el desarrollo y coordinación de las técnicas de ADN aplicadas a los controles de paternidad equino. Por otro lado se estimula a los diferentes laboratorios a que comiencen a realizar estudios encaminados a poner a punto este tipo de técnicas y al almacenamiento de muestras para su posible análisis futuro.

En noviembre de 1993 se realiza un test de comparación con 40 muestras de caballo de diferentes razas procedentes del Genetics Lab. Triniini de Helsinki (Finlandia). Se propuso realizar la primera prueba de tipificación con microsatélites, pero solamente cinco laboratorios presentan resultados de cinco marcadores y con resultados dispares.

En marzo de 1994 se envían muestras de 40 caballos Pura Sangre Inglés desde el Equine Blood Typing and Research Centre de la Universidad de Massey en Nueva Zelanda. Se invita a los laboratorios a realizar un nuevo test de comparación con microsatélites. Participan 17 laboratorios que ofrecen resultados

de un total de 23 microsatélites distintos, aunque sólo cinco lo hacen con los mínimos recomendados, entre ellos el Laboratorio de Grupos Sanguíneos de Córdoba. Con esta prueba se constata que aún empleando técnicas diferentes los resultados son idénticos y que la disposición de los investigadores para incorporar la nueva tecnología en los laboratorios es positiva. El comité de caballos de la ISAG envía posteriormente los resultados de tipificar las primeras cuatro muestras con un total de 23 microsatélites, para poderlas utilizar como patrones en los posibles análisis y futuras pruebas que se realicen.

En los tests de comparación de 1995 y 1996 participan 22 laboratorios en la pruebas de ADN y son 10 los que presentan resultados de 10 o más marcadores. La conclusión más importante es que se demuestra su eficacia y utilidad para realizar las pruebas de paternidad en caballos, autorizándose su empleo en la resolución de casos dudosos. Debido a que no todos los laboratorios han podido poner a punto este tipo de técnicas no se establece un número de marcadores mínimo obligatorio. El Veterinary Genetics Laboratory de la School of Veterinary Medicine de la Universidad de California (EE.UU.) comunica que ya ha comenzado la tipificación sistemática de la raza Quarter Horse, estableciendo así un punto de referencia en cuanto a la aplicación de esta técnica y solución de problemas inherentes a la tipificación de un gran número de ejemplares.

### EL ADN Y EL LABORATORIO DE GRUPOS SANGUÍNEOS

En año 1992 concurren una serie de circunstancias que hacen que la Dirección del Laboratorio de Grupos Sanguíneos de Córdoba se interese por el desarrollo de esta nueva tecnología. En primer lugar, el ineludible interés de formación científica continuada inherente a la responsabilidad de mantener el laboratorio al día. Por otro lado, las recomendaciones de la ISAG durante la XXIII Conferencia Internacional realizada en Interlaken (Suiza) para que los laboratorios comiencen a estudiar las posibilidades reales de aplicar estas técnicas. También, la reciente incorporación a la plantilla del laboratorio de un nuevo veterinario militar permitiría enfocarle exclusivamente al estudio e investigación sobre el ADN sin que se viera lesionada la actividad diaria de tipificación equina. Y, finalmente, el disponer de un convenio de colaboración con la Universidad de Córdoba y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, contando en el propio laboratorio con la inestimable presencia y ayuda de un colaborador científico, y un moderno equipamiento para el desarrollo de estas técnicas.

Dadas estas circunstancias, la Jefatura de Cría Caballar apoyó este proyecto dotando de los medios económicos dentro de las posibilidades de cada momento.

Con la intención de dar la máxima formación científica al nuevo oficial veterinario se le estimula a realizar una Tesis Doctoral cuyo tema principal fuera el establecimiento de las técnicas de tipificación equina basadas en los microsatélites.

Durante el transcurso del año 1993 se pone a punto la técnica de amplificación de ADN con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), herramienta fundamental para estudiar variabilidad en microsatélites, y la técnica de electroforesis para la

interpretación de los resultados obtenidos. Es importante indicar que las técnicas se van adaptando al laboratorio a medida que se van aportando experiencias en las publicaciones científicas, lo cual añade una gran complejidad a este desarrollo. En la actualidad están ya más fijadas simplificándose esta puesta a punto. En este mismo año se establece una meta: participar en la primera prueba de contrastación internacional que se organizaba con microsatélites, pero fue imposible cumplir los plazos previstos para el envío de los resultados. Algo similar ocurrió con el resto de laboratorios ya que sólo cinco de ellos participaron y con disparidades manifiestas. El esfuerzo que se realizó no fue baldío pues en marzo de 1994 se participa con éxito en el siguiente test de comparación con ADN que a todos los efectos se considera como el primero. Los resultados se discuten en la XXIV Conferencia Internacional de Genética Animal, celebrado en Praga (República Checa), y se insiste de nuevo para que los distintos laboratorios comiencen a ensayar estas técnicas.

En septiembre de 1995, G. Guerin, del Laboratoire de Génétique Biochimique, INRA-CJR, Jouy-en-Josas (Francia), responsable de organizar los tests de comparación ADN, solicita a los laboratorios que estén trabajando en este campo que suministren datos y contribuyan con su opinión a organizar las dos pruebas siguientes. El Laboratorio de Grupos Sanguíneos de Córdoba participa de forma activa junto con otros seis más enviando las estadísticas de sus resultados experimentales y las pruebas realizadas con algunos microsatélites que se acababan de descubrir en este laboratorio. Finalmente se incorporaron dos de ellos en los dos tests de comparación siguientes.

En el año 1995 y 1996 se continúan las investigaciones sobre microsatélites empleando un secuenciador automático del Servicio de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Córdoba. Se participa de nuevo en las pruebas internacionales de comparación con metodología no automática y automática (empleo del secuenciador) tipificando un total 42 muestras con los 25 microsatélites propuestos. El interés de la tipificación automática se basa en la disminución del coste por muestra y la capacidad de procesamiento de un gran número de ellas, siendo inevitable recurrir a este sistema cuando estas técnicas se realicen de forma ordinaria. El ejemplo está en el Veterinary Genetics Laboratory de la School of Veterinary Medicine de la Universidad de California (Estados Unidos) que en estos dos años tipifica unos 70.000 caballos, algo impensable de realizar de forma manual (no automática).

En el año 1996 el Laboratorio de Grupos Sanguíneos, a través de uno de sus miembros, es nombrado miembro de la Sociedad Internacional de Hemogenética Forense a propuesta de los doctores don Angel Carracedo Suárez y doña María Soledad Rodríguez Calvo del Departamento de Medicina Forense de la Facultad de Medicina en la Universidad de Santiago de Compostela. La intención es que el laboratorio desde esta magnífica atalaya sea un buen observador de los avances en las técnicas de identificación forense que son las que, al fin y al cabo, marcan la trayectoria a seguir en el futuro en el mundo animal.

En junio de 1996 se publican las secuencias de los tres primeros microsatélites equinos descritos en España denominados HLM 2, 3 y 5 (16).

En diciembre de 1996 se defiende la Tesis Doctoral realizada en el Laboratorio de Grupos Sanguíneos titulada "Polimor-

fismo de ADN equino. Obtención de marcadores moleculares y su aplicación al control de filiación" (17) que, además de servir para establecer y conocer las técnicas básicas de manipulación del ADN, aporta siete nuevos microsatélites, de los cuales dos de ellos tienen utilidad en las pruebas de paternidad según criterio selectivo de la ISAG.

## PERSPECTIVAS FUTURAS DEL CONTROL DE PATERNIDAD CON ADN

Aunque la implantación de forma sistemática de esta tecnología parece imparable, hay una serie de circunstancias que están provocando que no lo haga a la velocidad que se podría esperar.

Normalmente el empleo de nuevas tecnologías en cualquier campo de la ciencia emana de una necesidad imperiosa por mejorar las existentes en un momento dado. Así, los laboratorios de tipificación equina surgen cuando las asociaciones de criadores de caballos necesitan unos medios más eficaces de identificación y control de la paternidad. Al igual que en el mundo del caballo, ya ocurría lo mismo con otras especies animales de renta, como el ganado vacuno, porcino y aviar fundamentalmente. En la actualidad, la problemática de cada una de estas especies es diferente, aunque en estos casos, los planes de mejora están muy avanzados y es muy importante controlar la genealogía de los individuos, también se están realizando investigaciones encaminadas a combatir las enfermedades genéticas que van apareciendo. Los proyectos enfocados a conocer la totalidad del ADN en estas especies reciben gran cantidad de recursos procedentes de organismos gubernamentales y privados, dado el indiscutible interés económico que representan. En el caso del caballo las circunstancias son distintas, parece que las asociaciones de ganaderos no están exigiendo un mejor control de paternidad, pues los resultados que se ofrecen hoy en día con las técnicas en vigor son suficientes para sus necesidades. Por otro lado no hay, hasta ahora, exhaustivos planes de mejora en marcha que exijan un conocimiento más profundo de la genética del caballo. Los laboratorios de tipificación más modestos se hacen eco de esta falta de exigencia de las asociaciones y no están dispuestos a cambiar a la tecnología del ADN hasta que las circunstancias lo hagan inevitable.

Otro tipo de problemas que se están poniendo de manifiesto son los generados por la necesidad de pagar derechos de patentes. Así, la técnica de la PCR está patentada por el laboratorio americano Hoffman la Roche y tiene derecho a cobrar por el uso de esta tecnología. Cuando se trata de investigación pura renuncia a sus derechos, pero no lo hace cuando una empresa u organismo cobra unos servicios apoyados en el empleo de la PCR. En la última reunión celebrada en el seno del XXV Congreso Internacional de Genética Animal en Tours (Francia) se discute este problema, contando con la asistencia de representantes de la casa comercial depositaria de la patente. La solución que ha adoptado el Veterinary Genetics Laboratory de la School of Veterinary Medicine de la Universidad de California (Estados Unidos) es pagar una tasa única anual de unos 4 millones de pesetas con independencia de las muestras tipificadas. Otra solución es llegar a un acuerdo en función de las muestras

## El ADN en el Laboratorio de Grupos Sanguíneos

tipificadas o, también, comprar parte de los reactivos a un proveedor autorizado, de forma que el precio incluya tales derechos.

Otra circunstancia que también está enlenteciendo la incorporación de estas técnicas es que se conocen aún muy pocos microsatélites, apenas un centenar. Esto se debe a que los investigadores prefieren dedicarse a otras especies con las que es más fácil conseguir proyectos de investigación. El problema que representa el disponer de pocos marcadores es que se reducen las posibilidades de elegir los más idóneos; en el caso de la medicina forense se han escogido apenas una docena de entre casi 6.000 marcadores probados. Esto implica problemas a todos los niveles, desde la propia amplificación del ADN con la PCR, hasta la interpretación correcta de los resultados obtenidos.

Como conclusión final cabe deducir de todo lo expuesto que la tipificación equina con ADN es ya una realidad, y no se puede renunciar al conocimiento de la misma máxime cuando empiezan a ponerse en juego muchos intereses comerciales, y cuando la profesionalización del mundo del caballo parece que comienza a hacerse patente con la exigencia de unos servicios de la más alta calidad y tecnología.

El Laboratorio de Grupos Sanguíneos, en la actualidad, dedica parte de sus recursos al conocimiento de estas técnicas y se encuentra preparado, desde el punto de vista de la formación científica de su personal, para afrontar el futuro más inmediato sin temor de no estar a la altura de los mejores laboratorios del mundo, manteniendo así el prestigio y el nivel de servicio que ha tenido siempre, inspirado en el espíritu de esfuerzo y dedicación de aquellos que promovieron su creación y de los que han continuado esta labor durante años.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Podliachouk L. Les Antigènes de Groupes Sanguins des Equidés et leur Transmission Hériditaire. Thèse Doctorale. Université de Paris 1957.

2. Bailey E. Usefulness of lymphocyte typing to exclude incorrectly assigned paternity in horses. *American J Veterin Res* 1984;45:1218-1222.
3. Braend M. Genetic variation of horse haemoglobin. *Hereditas* 1967;58:385-390.
4. Bowling AT, Clark RS. Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 1985;16:93-108.
5. Rodríguez-Gallardo PP. Estudio comparativo preliminar del caballo Pura Raza Español (P.R.E.) con otras razas mediante el polimorfismo sanguíneo. *Med Mil (Esp)* 1992;48:78-83.
6. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 1985;316:76-79.
7. Brown WM, George MJr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1979;76:1967-1971.
8. Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Human Genet* 1989;44:397-401.
9. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl Acids Res* 1989;17:6463-71.
10. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Human Genet* 1989;44:388-396.
11. Stallings RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE, Moyzis RK. Evolution and distribution of (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences in human genomes. *Genomics* 1991; 10:807-815.
12. Moazami-Goudarzi K, Vaiman D, Mercier D, Grohs C, Furet JP, Levéziel H, et al. Emploi de microsatellites pour l'analyse de la diversité génétique des races bovines françaises: premiers résultats. *Génétique Sélection Evolution* 1994;26 (Suppl.1):155-165.
13. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1989;239:487-491.
14. Mullis K, Falcoma F, Scharf S, Snikl R, Horn GT, Erlich H. Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 1986;51:260.
15. Ellegren H, Johansson M, Sandberg K, Andersson L. Cloning of highly polymorphic microsatellite in the horse. *Anim Genet* 1992;23:133-142.
16. Vega-Pla JL, Garrido JJ, Dorado G, de Andrés-Cara DF. Three new polymorphic equine microsatellites: HLM2, HLM3, HLM5. *Anim Genet* 1996;27:215.
17. Vega-Pla JL. Polimorfismo de ADN equino. Obtención de marcadores moleculares y su aplicación al control de filiación. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba 1996.