

Variantes electroforéticas eritrocitarias en el caballo pura raza español (P.R.E.)

Pedro Pablo Rodríguez Gallardo*

RESUMEN

Sobre una amplia muestra de caballos de Pura Raza Española (N = 1099), se investiga la variabilidad de cuatro sistemas genéticos eritrocitarios al objeto de contribuir a la definición del perfil genético de dicha raza, así como también a la determinación de la Probabilidad de Exclusión (P_e) de estos sistemas en las pruebas de investigación biológica de la paternidad.

Las frecuencias alélicas y P_e obtenidas fueron 6-PGD (D = 0.001, F = 0.883, S = 0.107, PE = 8.88%); PGM (F = 0.080, S = 0.920, V = 0, P_e = 6.81%); PHI (F = 0.080, I = 0.916, S = 0, P_e = 6.67%); Hb (A = 0.005, AII = 0.054, BI = 0.772, BII = 0.165, P_e = 18.62%). La P_e integrada para los cuatro sistemas estudiados en la raza PRE fue 35.64%.

Finalmente se describe también la técnica de focalización isoelectrica en poliacrilamida (PAGIGF) empleada para la detección de las variantes electroforéticas del sistema Hb.

SUMMARY

Research is carried out on a wide sample of Thoroughbred Spanish horses (N = 1099) of the feasibility of four erythrocytic genetic systems, in order to contribute both to the genetic profile of this breed, and also to the determination of the Exclusion Probability (P_e) of these systems in tests to biologically determine paternity.

The allelic frequencies and P_e obtained were 6-PGD (D = 0.001, F = 0.883, S = 0.107, PE = 8.88%); PGM (F = 0.080, S = 0.920, V = 0, P_e = 6.81%); Hb (A = 0.005, AII = 0.054, BI = 0.772, BII = 0.165, P_e = 18.62%). The integrated P_e for the four systems studies for the Thoroughbred Spanish breed was 35.64%.

Finally, a description is given of the isoelectrical focalizing in polyacrilamide (PAGIGF) used to detect electrophoretic variants in the Hb system.

INTRODUCCION

En un trabajo anterior, publicado en esta revista (Rguez-Gallardo, 1991), abordamos el estudio del poliformismo bioquímico de las proteínas séricas en el caballo PRE. Ahora, nos ocupamos de detectar la variabilidad genética que presentan las enzimas y proteínas eritrocitarias, para así completar la descripción del polimorfismo bioquímico sanguíneo del caballo PRE, satisfaciendo los objetivos propuestos en el artículo anteriormente mencio-

nado, relativos a la definición del perfil genético del caballo PRE, fijación de las frecuencias alélicas de los sistemas genéticos que nos proponemos estudiar, su adecuado conocimiento para emplearlos en la investigación biológica de la paternidad mediante el cálculo de su Probabilidad de Exclusión (P_e), y en fin las posibles orientaciones en el campo de la evolución filogenética del caballo PRE, así como la contribución al conocimiento científico de la raza.

Las enzimas y proteínas objeto

de este trabajo, que ha sido realizado sobre una amplia muestra de caballos PRE, son los siguientes:

- 6-Fosfogluconato deshidrogenosa (6-PGD).
- Fosfoglucomutasa (PGM).
- Fosfohexosa isomerasa (PHI).
- Hemoglobina (Hb).

Todas estas enzimas y proteínas son admitidas, por la Asociación Internacional de Genética Animal (I.S.A.G.), para intervenir en las pruebas de paternidad, ya que constituyen sistemas genéticos multia-

AGRADECIMIENTO:

A D. Rafael Jiménez Seguí y a D.ª María del Carmen Martínez Parlón, Auxiliares de Laboratorio, por su inestimable colaboración en el desarrollo de las técnicas.

* Capitán Veterinario.
Doctor en Veterinaria.
Diplomado en Genética y Reproducción.
Laboratorio de Grupos Sanguíneos. Cría Caballar. Córdoba.

léllicos de herencia codominantes comprobada.

La 6-PGD es una enzima (E.C. 1.1.1.4.4) que presenta estructura dimérica e interviene en el ciclo oxidativo de la glucosa 6-fosfato, produciendo la oxidación decarboxilante del 6-fosfogluconato que procede de la oxidación de la glucosa 6-fosfato. Bergman y Gustavson (1971) investigaron el polimorfismo genético de esta enzima del caballo, encontrando tres fenotipos denominados F, FS y S. Los tipos F y S estaban constituidos por una sola banda, siendo la correspondiente a F más anódica que la de S. El fenotipo FS estaba compuesto por tres bandas, siendo la central la más intensa. Posteriormente Sandberg y Bengtsson (1972) encontraron tres nuevos fenotipos, uno estaba compuesto por una sola banda, anódica respecto a F, que fue denominada D. Los otros dos fenotipos, compuestos por tres bandas, fueron llamados DF y DS. Los estudios familiares correspondientes han demostrado que el locus 6-PGD comprende tres alelos autosómicos codominantes que son 6-PGD D, F y S (Figura 1).

La fosfoglucomutasa (E.C. 2.7.5.1) es una enzima eritrocitaria que se comporta como una fosfotransferasa que cataliza la conversión de

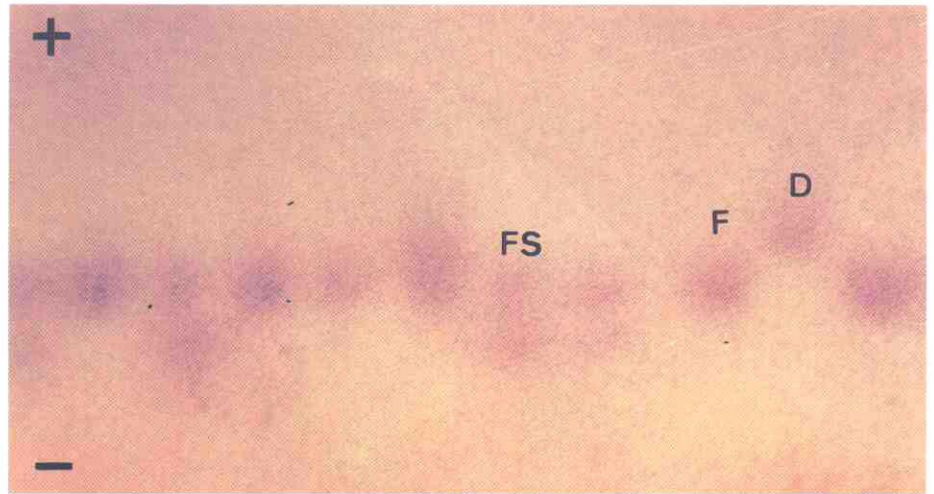


Figura 1. Variantes electroforéticas de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD) en gel de almidón.

glucosa 1-fosfato en glucosa 6-fosfato, en presencia de pequeñas cantidades de glucosa 1,6-difosfato, y de magnesio. Ya en 1964 Spencer *et al.* mostraron el polimorfismo de la PGM en hemolizados humanos empleando geles de almidón. Posteriormente diversos autores se han ido ocupando de estas investigaciones en el resto de las especies animales. Bengtsson y Sandberg (1972) encontraron tres fenotipos de PGM, en hemolizados de eritrocitos de caballo, denominados F, FS y S. El tipo más anódico fue F y lo integran fundamentalmente dos bandas intensas. El fenotipo S presenta una imagen similar a F pero más catódica. Finalmente la imagen de FS es mixta entre las dos anteriores. En 1974 Scott detecta un

nuevo alelo denominado V, que presenta una imagen electroforética homóloga a los alelos anteriormente descritos, pero de localización más catódica. En fin el locus PGM está constituido por tres alelos autosómicos codominantes que en sentido a ánodo-cátodo se denominan PGM F, S y V (Figura 2).

La enzima fosfohexosa isomerasa (E.C. 5.3.1.9) interviene en el metabolismo glucídico catalizando la conversión reversible de glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato. El polimorfismo genético de esta enzima eritrocitaria del caballo fue puesto de manifiesto por primera vez por Sandberg (1973) quien describió tres electromorfos bien definidos que se corresponden con tres alelos, uno anódico denominado PHI F, otro más catódico llamado PHI S y el tercero intermedio entre ambos consignado como PHI I (Figura 3). Todos ellos se han podido demostrar que se corresponden con genes autosómicos codominantes. Recientemente Bowling y Wictum (1988) han propuesto la existencia de un cuarto alelo en el locus PHI denominado L y hasta ahora, sólo ha sido descrito en las razas *American Saddlebred* y *Tennessee Walking Horse* con una frecuencia génica de 0.009.

Bangham y Lehmann (1958) describieron por primera vez el polimorfismo genético de la hemoglobina (Hb) en el caballo observando que la mayoría de los caballos presentaban dos bandas distintas sobre geles de almidón, identificándose dos posibles fenotipos. Schmid (1965) y Braend (1967) confirmaron

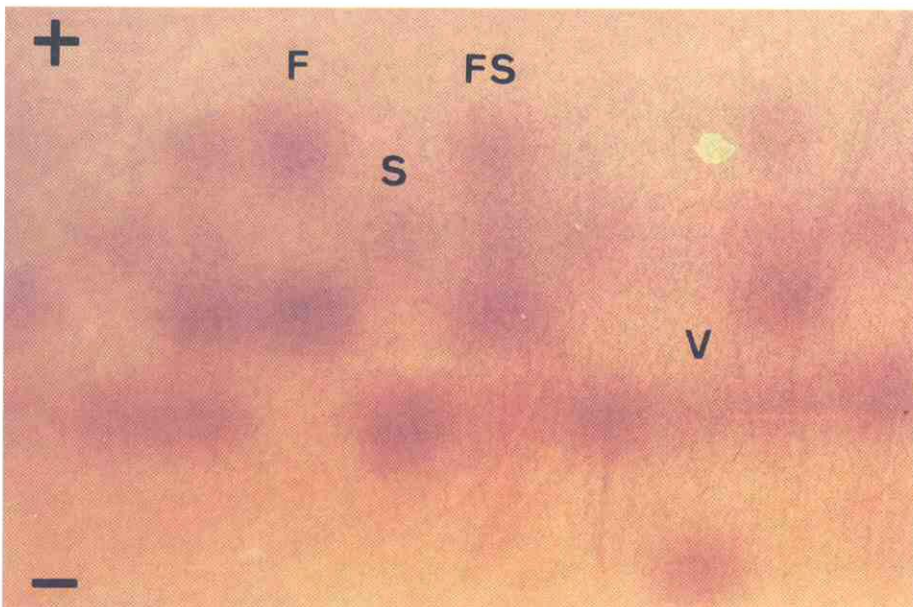


Figura 2. Diversos fenotipos de fosfoglucomutasa (PGM) en gel de almidón.

estas observaciones y aportaron la posibilidad de un tercer fenotipo. Hoy día con la aplicación de las nuevas técnicas electroforéticas de alta resolución, como la Focalización Isoeléctrica, se ha podido avanzar bastante en el conocimiento de este completo sistema genético, el cual está integrado por cuatro alelos denominados Hb A, A II, B I y B II que presentan una herencia codominante (Figura 4).

MATERIAL Y METODO

La muestra estudiada la componen 1099 individuos reproductores de ambos sexos, pertenecientes a la Pura Raza Española de caballos (P.R.E.) que se encuentran controlados por el *Stud-book* nacional (Registro-Matrícula de Caballos y Yeguas de Pura Raza Española). La procedencia de la muestra abarca todo el territorio nacional, si bien existe predominio de aquellas localizaciones donde el censo equino es mayor.

Las muestras de sangre de estos équidos fueron analizadas, durante el año 1989, en el Laboratorio de Grupos Sanguíneos de Córdoba (Cría Caballar - C.S.I.C.) para su tipificación mediante marcadores genéticos, al objeto de tener perfectamente identificada la cabaña equina nacional de razas selectas y proceder al control de paternidad.

Los análisis de las muestras se efectuaron dentro de la primera semana, desde su recepción en el laboratorio, para evitar la pérdida de actividad de las enzimas a investigar.

A partir del tubo de sangre con anticoagulante (normalmente ACD) se obtuvo un sedimento de eritrocitos lavados por solución salina 0.9% y sucesivas centrifugaciones (3.000 r.p.m.). Este sedimento fue adicionado de una gota de agua destilada y sometido a sucesivas congelaciones y descongelaciones para provocar la hemólisis. Finalmente se centrifugó y del líquido sobrenadante se extrajo la muestra para insertar los geles correspondientes.

La metodología empleada en la

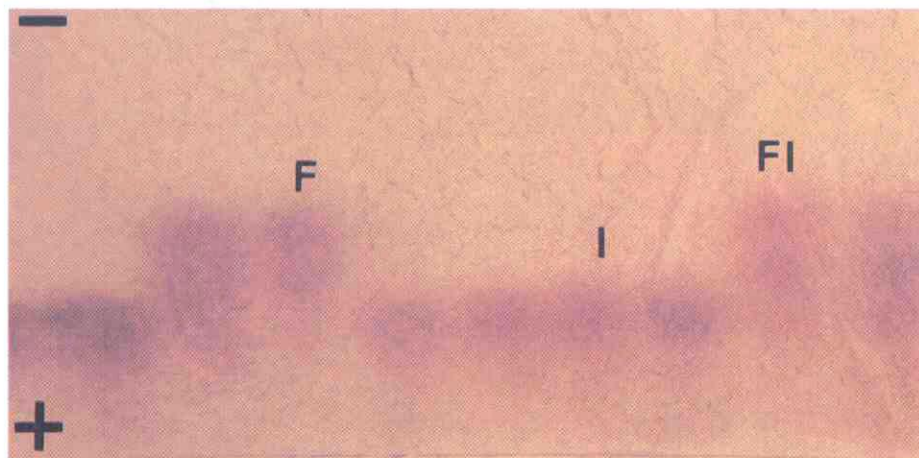


Figura 3. Variantes electroforéticas de Fosfohexosa isomerasa (PHI) en gel de almidón.

investigación de las tres enzimas eritrocitarias fue la adscrita por Bengtsson y Sandberg (1973) aplicando la electroforesis ($I = 90$ mA) durante 24 horas, sobre geles de almidón alojados en cámara frigorífica a 4° C (Figuras 1, 2 y 3).

En cuanto a la hemoglobina se empleó la técnica de focalización isoelectrica en poliacrilamida (PAGE-IEF) de Torres (Comunicación personal, USA 1987) modificada por Rguez-Gallardo (Figura 4) y que describimos a continuación. El equipo electroforético empleado fue el IEF Pharmacia.

Solución acrilamida (8.68 g.), bis-acrilamida (0.31 g.) en 100 mls. agua d.

Persulfato amónico 0.7 g./100 mls. agua d.

Gel: 4.5 mls. agua d.

6. mls. solución de acrilamida.

0.12 mls. Pharmalyte 3-10.

0.5 mls. Pharmalyte 6-8.

0.9 mls. persulfato amónico.

12 μ TEMED.

Dimensión del gel: $21 \times 10 \times 0.25$ mm.

Muestras: 8μ de hemolizado sobre papel Whatman, 3 (3×2 mm.).

Parámetros eléctricos: 9 w. constantes con 30 minutos de preenfriado a 4.5 w. Frío: $12-14^{\circ}$ C.

Emigración: 40-45 minutos (enfriado).

Fijación: Acido tricloroacético al 10% durante 15 minutos.

Para el cálculo de la Probabilidad de Exclusión (P_e) se ha empleado el algorítmico informático descrito por Huguet *et al.* (1988).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla I se exponen la distribución de individuos entre los diferentes fenotipos que se presentaron en los distintos sistemas genéticos estudiados. En cuanto a la 6-PGD, de los 6 fenotipos posibles que se pueden formar con sus tres alelos (D, F, S), se presentarán $\frac{4}{6}$ siendo los mayoritarios, sobre todo,

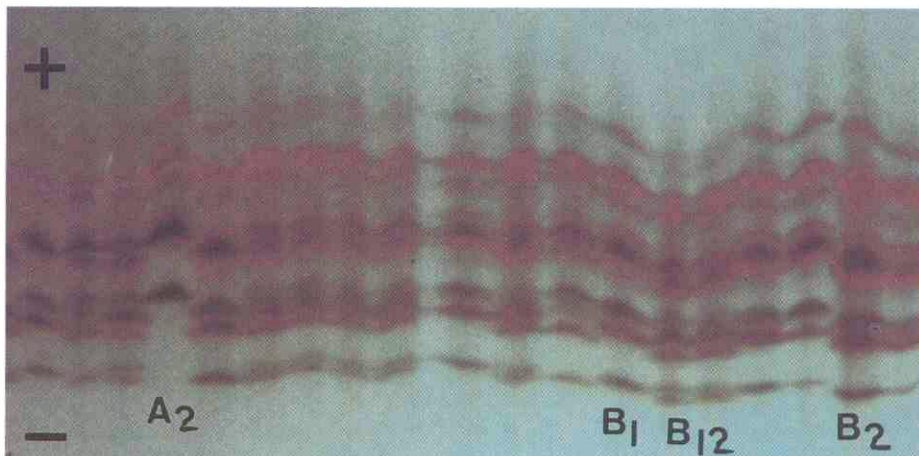


Figura 4. Diversos fenotipos de Hemoglobina (Hb) en gel de poliacrilamida (IEF).

el homocigoto FF y FS, ostentando el heterocigoto DF un valor testimonial.

La PGM, que con sus tres alelos (F, S, V) puede originar 6 fenotipos, sólo presentó en el caballo PRE tres, siendo el homocigoto SS el más importante, seguido a bastante distancia de FS. la PGM FF sólo se presentó en 10 individuos.

La PHI (alelos F, I, S) al igual que la anterior sólo presentó la mitad de sus posibilidades en la expresión fenotípica, presentándose mayoritariamente II (923 individuos) seguido de FI (167) y FF con sólo 9 individuos.

En cuanto a la hemoglobina, que con cuatro alelos reconocidos puede originar 10 fenotipos, presentó 8 posibles, siendo el de mayor frecuencia BI BI a continuación BI BII, AII BI y BII BII. A otro nivel mucho menor de frecuencia, se situaron A BI, AII AII, AII BII y A BII. Ningún individuo presentó los fenotipos A A y A AII.

La distribución de fenotipos en la población estudiada sirvió de base para el cálculo de las frecuencias alélicas que figuran en la Tabla II y éstas a su vez, fueron indispensables para la determinación de la Probabilidad de Exclusión (P_E) de cada sistema genético como valoración de su eficacia en los tests de paternidad.

Las frecuencias génicas del sistema 6-PGD no tienen una distribución homogénea entre sus tres alelos, sino que se encuentran

6-PGD	PGM	PHI	Hb	
FF 862	SS 933	FF 9	BI BI 680	AII BII 5
SS 19	FF 10	II 923	BII BII 67	AII BI 108
DF 2	FS 156	FI 167	BI BII 221	A BII 2
FS 216			AII AII 6	A BI 10

Tabla I.—Distribución de fenotipos de 4 sistemas genéticos en el caballo PRE (N = 1099).

desplazadas hacia 6-PGD F. Con un valor mucho menor, a continuación, se sitúa 6-PGD S y finalmente el alelo 6-PGD D con 0.001 tiene una significación reducidísima.

Los sistemas PGM y PHI son prácticamente idénticos en el caballo PRE, en cuanto a la distribución de frecuencias génicas. Ambos, de 3 alelos, quedan reducidos a 2 por no presentarse PGM V y PHI S. Los alelos predominantes son PGM S y PHI I.

En la hemoglobina existe un predominio de Hb B sobre A, siendo BI el alelo mayoritario, seguido de BII. No obstante, el hecho de que este sistema tenga 4 alelos y los otros 3 sistemas prácticamente 2, hace que su P_E (18.62%) sea ostensiblemente más elevada (Tabla II) y nada desdeñable en las pruebas para la investigación biológica de la paternidad. La P_E acumulada para los 4 sistemas genéticos eritrocitarios es del 35.64%, lo cual nos indica que no podemos prescindir de estas determinaciones en los test de paternidad.

En relación con el sistema 6 PGD, en todas las razas que figuran en la Tabla III se comprueba que existe un desplazamiento de la frecuencia alélica hacia el alelo F,

siendo menor esta desviación en el caballo Pura Sangre Inglés y Arabe y esto redundando en una elevación de su P_E al 18%. Sin embargo el PRE, en este aspecto encuentra más parecido con el Berberisco y el Caballo de Tiro Belga, el cual presenta la mayor frecuencia de 6-PGD D, seguido del caballo Arabe. El resto no presentan dicho alelo.

El alelo PGM V está ausente en todas las razas relacionadas en la Tabla III, siendo la frecuencia mayor para PGM S y más pequeña para PGM F, resultando en el caballo Pura Sangre Inglés tan baja que el sistema es monomórfico presentando una P_E de cero. Únicamente en el Caballo de Tiro Belga las diferencias entre las frecuencias PGM S y F son algo menos del doble. En las demás razas es bastante más, acusándose en el PRE, por lo que la P_E del sistema PGM es menor que en las razas Arabe y Trotador. Por último hay que hacer notar que nuestros resultados en el sistema PGM son algo distintos a los obtenidos por Kaminski y Andres (1986), lo cual puede ser imputable al tamaño y procedencia de la muestra utilizada por estos autores.

El sistema genético PHI (Tabla III) resulta ser monomórfico en la raza Pura Sangre Inglés y prácticamente en el Arabe y Berberisco también. Es dimórfico en el PRE y Trotador, con una distribución de frecuencia alélicas muy sesgada hacia PHI I, lo que contribuye a que sus P_E sean 6.87 y 8% respectivamente. Únicamente el caballo de Tiro Belga presenta frecuencias en los tres alelos.

Finalmente en cuanto al sistema de hemoglobina, en el caballo PRE se presentan los 4 alelos Hb, mientras que no sucede igual en la raza Pura Sangre Inglés y Arabe, donde según Bowling y Clark (1985) no se presentan los alelos Hb A y AII. Por

6-PGD	PGM	PHI	Hb
D 0,001	F 0,080	F 0,080	A 0,005
F 0,883	S 0,920	I 0,916	AII 0,054
S 0,107	V 0	S 0	BI 0,772
			BII 0,165
P_E 8,88%	6,81%	6,87%	18,62%
$P_{E\text{ TOTAL}}$ para 4 sistemas = 35,64%			

Tabla II.—Resultados de frecuencias alélicas y Probabilidad de Exclusión (P_E) para 4 sistemas genéticos en el caballo PRE.

otra parte las frecuencias alélicas en PRE están ostensiblemente desplazadas hacia Hb BI, mientras que en el caballo Pura Sangre Inglés esta desviación es hacia Hb BII. Lo mismo ocurre, pero menos acentuadamente, con la raza Trotador en la cual, al presentar frecuencia los alelos Hb A y una distribución homogénea los alelos Hb B, su P_E es la más elevada (21%). En el PRE aunque esta distribución está muy sesgada hacia Hb BI, el hecho de presentar Hb AII una frecuencia nada desdeñable, contribuye a una elevación en la P_E (18.62%) de dicha raza.

Por último si se integra la P_E obtenida para los 4 sistemas estudiados (35.64%), con la P_E correspondiente a los 6 sistemas investigados por Rguez-Gallardo (1991) (alfa-1 antitripsina, albúminas, proteína G_c, esterasa, alfa-1 B glucoproteína, transferrina. P_E 86.65%) se obtiene una P_E total de estos 10 sistemas de polimorfismo bioquímico en PRE cifrada en 91.41%, la cual es superior a la obtenida en la raza Pura Sangre Inglés (87.89%) y Arabe (90.26%).

Si a estos 10 sistemas se les integra la P_E de cada uno de los 7 sistemas de Grupos Sanguíneos (A,C,D,K,P,Q,U), que intervienen en las pruebas de paternidad, es fácil comprender que la P_E será prácticamente del 100%.

	PRE(1) N=1099	PRE(2) N=300	PSI(3) N=100*	á(3) N=100*	SB(3) N=100*	B(4) N=36	CTB(5) N=536
6-PGD	D 0,001 F 0,883 S 0,107	0 0,870 0,131	0 0,648 0,352	0,005 0,652 0,343	0 0,845 0,155	0 0,920 0,080	0,010 0,980 0,010
P_E	8,88%		18%	18%	11%		
PGM	F 0,080 S 0,920 V 0	0,146 0,854 0	N=1.568* 0,002 0,998 0	N=987* 0,111 0,889 0	N=484* 0,150 0,850 0	0,020 0,980 0	0,356 0,650 0
P_E	6,81%		0%	9%	11%		
PHI	F 0,080 I 0,916 S 0	0,070 0,930 0,001	N=646* 0 1 0	N=561* 0,011 0,989 0	N=139* 0,097 0,903 0	0,010 0,990 0	0,030 0,940 0,030
P_E	6,87%		0%	1%	8%		
Hb	A 0,005 A II 0,054 BI 0,772 BII 0,165		N=200* 0** 0,198 0,802	N=682* 0** 0,565 0,435	N=242* 0,019** 0,459 0,522		
P_E	18,62%		13%	18%	21%		

(1) Nuestros resultados; (2) Kaminski y Andrés, 1986;
(3) Bowling y Clark, 1985; (4) Kaminski y Duncan, 1981;
(5) Bouquet *et al.*, 1987;
* Muestra escogida al azar de entre toda la población tipificada (PSI = 78.000; á = 25.000 y SB = 5.600 individuos).
** Incluye A y AII.

Tabla III.—Frecuencias alélicas y Probabilidad de Exclusión (P_E) de 6-PGD, PGM, PHI y Hb en las razas PRE, Pura Sangre Inglés (PSI), Arabe (á), Trotador (SB), Berbeirco (B) y Caballo de Tiro Belga (CTB).

BIBLIOGRAFIA

- ANONIMO. 1928: "Registro-matricula de Caballos y Yeguas de Pura Raza Española". 1.ª ed. a 17ª ed. Jefatura de Cría Caballar. Madrid. 1989.
- BENGTSSON, S. y SANDBERG, K.: "Phosphoglucomutase polymorphism in Swedish horses". *Anim. Blood Grps. biochem. Genet.*, 3: 115-119. 1972.
- BENGTSSON, S. y SANDBERG, K.: "A method for simultaneous electrophoresis of four horse red cell enzyme systems". *Anim. Blood Grps. biochem. Genet.*, 4: 83-87. 1973.
- BERGMAN, H. y GUSTAVSSON, I.: "Variable starch electrophoretic pattern of the enzyme 6-Phosphogluconate dehydrogenase in a family of donkeys". (*Equus asinus*, L.). *Hereditas*, 67: 154-146. 1971.
- BOUQUET, Y., VAREWYCK, H., VAN DE WEGHE, A. y VAN ZEVELEN, A.: "Une étude du cheval de trait belge par les systèmes marqueurs de substances sanguines". *Ann. Méd. Vét.*, 131: 633-43. 1987.
- BOWLING, A.T. y CLARK, R.S.: "Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horse in the United States". *Anim. Blood Grps. biochem. Genet.* 16: 93-108. 1985.
- BOWLING, A.T. y WICTUM, E.: "Preliminary evidence for a fourth allele at the phosphohexose isomerase (Phi) locus of horse erythrocytes". *An. Genetics*. 19: 47-49. 1988.
- BRAEND, M.: "Genetic variation of horse haemoglobin". *Hereditas*. 58: 385-390. 1967.
- HUGUET, E., CARRACEDO, A. y GENE, M.: "Introducción a la investigación biológica de la paternidad". Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A. Barcelona. 1988.
- KAMINSKI, M. y DUNCAN, P.: "Hemotypes and Genetic Structure of Camargue Horses". *Biochem. Systematics and Ecology*. 9-4: 365-371. 1981.
- KAMINSKI, M. y DE ANDRES, D.F.: "Electrophoretic markers of andalusian horses comparison of spanish and lusitanian lineages". *Comp. Biochem. Physiol.* 83B. 3: 575-588. 1986.
- RGUEZ-GALLARDO, P.P.: "Polimorfismo bioquímico de las proteínas séricas en el caballo Pura Raza Español (PRE)". *Medicina Militar*, 1991 (en prensa).
- SANDBERG, K. y BENGTSSON, S.: "Polymorphism of hemoglobin and 6-phosphogluconate dehydrogenase in horse erythrocytes". *Proc. 12 th European Conference Anim. Blood Grps. biochem. Polymorphism*. 527-531. Hungarian Acad. Sci. Press. Budapest. 1972.
- SANDBERG, K.: "Phosphohexose isomerase polymorphism in horse erythrocytes". *Anim. Blood Grps. biochem. Genet.* 4: 79-82. 1973.
- SCHMID, D.O.: "Über den Hämoglobin-Polymorphismus beim Pferd". *Zeitschrift für Immunitätsund Allergieforschung*. 128: 499-503. 1965.
- SPENCER, N., HOPKINSON, D.A. y HARRIS, H.: "Phosphoglucomutase polymorphism in man". *Nature Lond.* 204: 742-745.
- TORRES, M.C.: Comunicación Personal. USA. 1987.