

## POLIMORFISMO BIOQUIMICO DE LA RAZA CAPRINA GRANADINA.

(BIOCHEMICAL POLYMORPHISM OF THE GRANADINA GOATS).

por

RAFAEL GARZON GARRIDO-ESPIGA \*; ISAIAS ZARAZAGA BURILLO \*\*  
MIGUEL VALLEJO VICENTE \*\* y ANTONIO RODERO FRANGANILLO \*

### *Introducción*

La población de cabras en España, aún con tendencia a decrecer, representa un número de animales y un volumen de producción económicamente importante. Por otra parte, las razas existentes se encuentran todavía en estado de pureza o en cruce con otras razas españolas por cuanto son escasas las importaciones de animales reproductores extranjeros. Es interesante, por tanto, el estudio científico de estos animales, que en esta ocasión iniciamos con una raza, la granadina, de las más importantes de la región andaluza, haciéndolo desde el punto de vista de su polimorfismo bioquímico; más concretamente de algunas de las fracciones, cuyas técnicas de detección se encuentran montadas en nuestros laboratorios.

Las referencias a estos aspectos en razas españolas son nulas, si exceptuamos la tesis doctoral de uno de nosotros (R. Garzón, 1975), y la tesis de A. Garrido (1967), aunque en este caso se hace desde un punto de vista diferente al nuestro.

Las fracciones consideradas en este trabajo han sido: 1.º Transferrinas. El polimorfismo transferrínico fue descrito por Ashton y McDougall (1958). Estudios posteriores han sido llevados a cabo por Efremov y Braend (1965) en razas noruegas, Watanabe (1965) y Tjankow (1972) en la raza Togenbourg alemana y en razas nativas búlgaras, así como en

\* Laboratorio de Grupos Sanguíneos del Instituto de zootecnia del C. S. I. C. Facultad de veterinaria. Córdoba (España).

\*\* Departamento de Genética. Facultad de veterinaria. Zaragoza (España).

Proyecto de investigación aprobado por la Comisión asesora de Investigación científica y técnica.

Recibido para publicación el 12-11-1975.

sus cruces. Posteriormente, Watanabe y Suzuki (1973) amplían las razas estudiadas con anterioridad (Saanen, japonesas, cabras de Tokara, cabras de las islas de Rhukyu y Formosa, Saane suiza, raza alpina, etc.) a animales nativos de Corea, Filipinas y Tailandia, encontrando un nuevo alelo Tf<sup>C</sup>, que se agrega a los dos encontrados anteriormente.

2.º Hemoglobinas. El polimorfismo de las hemoglobinas fue observado en cabras por Khanolkar (1963). Bernhardt (1964) llega a la conclusión de que existen dos alelos que corresponden a tres fenotipos de hemoglobinas. Las diferencias en las hemoglobinas A y B adultas no estarían en las cadenas  $\alpha$  sino en las  $\beta$  (Bouquet, Y.) y Willems, A. E. R., 1971).

T. H. J. Huisman, J. B. Wilson y H. R. Adams (1967) indican que muchos investigadores han encontrado homogénea la hemoglobina de la cabra y que su movilidad electroforética es completamente similar a la hemoglobina A humana.

A las hemoglinas adultas habría que agregar la existencia de una hemoglobina fetal, que, según Cabannes y Serain (1955), emigra sobre papel con mayor velocidad que la adulta. Del polimorfismo de las razas noruegas se ocupan Efremov y Braend (1965), mientras que Tjankov (1972) lo hace en las razas ya indicadas, no encontrando polimorfismo.

3.º Albúmina. Los fenotipos de albúminas, semejantes a los de la oveja, fueron descritos por Efremov y Braend (1965). Ha sido objeto de estudio en el trabajo de Tjankov (1972), y en el de Suzuki y Watanabe (1968), así como en el de Salerno, Montemurro y L'Afflitto (1968) en las cabras del sur de Italia.

De los tres polimorfismos indicados se ocupan Osterhoff y Ward-Cox en las razas de cabras africanas.

4.º Potasio sanguíneo. J. V. Evans y A. T. Phillipson (1957) encuentran que algunas razas de cabras muestran un polimorfismo del sodio y el potasio sanguíneos muy similar al de la oveja. Esto fue confirmado por F. G. Peers (1962) en la raza caprina de Nigeria, Kano brown.

Rasmusen y Hall (1966) estudian la asociación del sistema M de antígenos eritrocitarios y los niveles de potasio en cabras, y Tucker y Ellory (1972) lo hacen respecto a la influencia del tipo de antígeno sobre el transporte del potasio activo en eritrocitos de ovejas y cabras.

5.º Electroforesis de proteínas séricas. Gorczyca, McCarty y Llimon (1959) en un estudio de las proteínas séricas de las cabras por electroforesis en papel y por métodos químicos encontraron una amplia distribución de los valores normales. Se comentaba también la aparición limitada de la fracción globulínica  $\alpha_2$ . Posteriormente, Gorczyca, McCarty y Lazaroni (1960) ampliaron su trabajo para determinar la influencia de la edad y de la raza en las distintas fracciones. A. Garrido (1967) en la raza caprina serrana andaluza demuestra la existencia de 11 fracciones distintas por inmunoelectroforesis y expone las cifras medias halladas por electroforesis sobre papel.

### *Material y métodos*

El material estudiado ha sido la sangre de treinta animales hembras, pertenecientes a la agrupación granadina, situados en la región de Loja (Granada) y propiedad de D. Antonio Alcaide.

Su «habitat» es la sierra de Loja, en terrenos que se encuentran a una altura de unos 650 m.

Su alimentación es a base de pastoreo y, únicamente en la época de paridera, reciben una alimentación complementaria.

Todas las hembras se encuentran, al iniciar el trabajo, en período de lactancia.

#### *Métodos.*

1. *Obtención de la muestra.*—La sangre obtenida por sangría de la yugular fue recogida en biotubos, que previamente habían sido lavados con ácido nítrico 6 N y enjuagados dos veces sucesivas con agua destilada y secados a la temperatura ambiente.

En uno de ellos la sangre no fue heparinizada, con el fin de obtener suero que se empleó en otras determinaciones.

En la otra serie de tubos se depositó previamente una gota de heparina (sal sódica del éster del ácido mucoítín polisulfúrico, o sal sódica de heparina), por cada 5 centímetros de sangre obtenida. Agitando suavemente para que el anticoagulante se mezcle bien con la sangre.

Cada muestra de sangre heparinizada se distribuyó de la siguiente manera:

- a) Un mililitro de sangre total para la determinación del potasio sanguíneo total.
- b) Sangre para la determinación de la relación plasma/células aglomeradas.
- c) Plasma completamente desprovisto de glóbulos rojos, mediante centrifugación a 2.500 revoluciones durante 15 minutos, destinado a la determinación del potasio plasmático.
- d) Glóbulos rojos lavados para la obtención de la hemoglobina.

2. *Método para la determinación del potasio.*—Tanto en sangre total como en plasma la determinación de potasio ha sido realizada en el fotómetro de llama (Flammer Photometer, Dr. B. Languer, Berlín) a 0'6/cm<sup>2</sup> de presión, alimentado con gas de butano según la técnica recomendada.

### 2/1. *Técnicas.*

*Preparación de las soluciones.*—Solución madre. Diluir 1'907 g de cloruro potásico en agua destilada con lo que obtenemos una solución de un g de potasio en 100 mililitros.

A partir de esta solución se obtiene la solución patrón mayor diluyendo un mililitro en 100 mililitros de agua (0'1 g/ml).

La solución patrón menor se obtiene partiendo de la solución patrón mayor, diluyendo 1 ml en 100 ml de agua (0'001 g/ml).

### *Preparación de la dilución del plasma.*

Las diluciones se prepararon diluyendo al 2 p. 100, en matraces aforados, cada uno de ellos.

### *Obtención y resultados.*

Para la obtención de los resultados se ha aplicado la siguiente fórmula, siguiendo las indicaciones del constructor del aparato:

$$C = C_1 + \frac{C_2 - C_1}{A_2 - A_1} (A - A_1)$$

siendo:

C. = Concentración del problema.

C1.=Concentración del patrón inferior.

C2.=Concentración del patrón superior.

A. =Lectura del problema.

A1.=Lectura patrón inferior.

A2.=Lectura patrón superior.

La transformación de las cantidades expresadas en miligramos por ciento en mEq/l, se obtiene multiplicando los miligramos por ciento por 0'256.

### 3/. *Obtención de la hemoglobina.*

Trasvasada la sangre a tubos de centrífuga, se realiza una primera centrifugación a 2.500 revoluciones por minuto, durante 15 minutos.

El plasma presente se aspira y se deposita en biotubos de los que posteriormente se toma la cantidad necesaria para la determinación del potasio.

Reemplazado el plasma por solución salina al 0'9 p. 100, se mezcla, mediante el agitador de tubos y se somete a una nueva centrifugación.

Se aspira el líquido sobrenadante y se reemplaza después de la centrifugación, dos veces consecutivas, en la última de las cuales se deja el paquete globular lavado.

Seguidamente y después de este último lavado, se añade un volumen igual de agua destilada, depositando los tubos en el congelador durante una noche con el fin de provocar la hemólisis total.

Con esto obtenemos una dilución al 50 p. 100 de la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos.

Al día siguiente se añade a cada tubo un cuarto de su volumen de tolueno y se agita fuertemente, centrifugándose a continuación.

Después de la centrifugación aparece un sobrenadante constituido por un residuo céreo y un líquido transparente que contiene la hemoglobina. En el fondo del tubo aparece el estroma globular.

A partir de esta dilución de hemoglobina se prepara otra que contenga aproximadamente el 2 p. 100 de la misma, que será empleada en la electroforesis.

La cantidad de hemoglobina en sangre no ha sido determinada, ya que, teniendo en cuenta que los resultados que se trataban de obtener habían de ser cualitativos, no lo consideramos necesario.

#### 4. *Método electroforético para la separación de las hemoglobinas.*

Se ha efectuado sobre un hemolizado con el 2 ó 3 p. 100 de hemoglobina.

1) Las tiras de acetato de celulosa de 17 por 4 cm son previamente sumergidas en el mismo tampón que se usa como puente para la electroforesis.

Nosotros hemos empleado el tampón tris glicocola (tri-hidroximetilaminometano, 14'1 g; glicocola, 22'6 g, y agua destilada c. s. p. 1.000 ml.)

El tampón así obtenido tiene un pH de 9'5 y una fuerza iónica de 0'075.

2) Previa eliminación del exceso de líquido, colocando las tiras entre dos hojas de papel de filtro, se extienden posteriormente sobre el puente de 11 cm de la cámara «Atom», cuidando de que quede bien plana y rápidamente se procede a colocar las muestras a un centímetro y medio del polo negativo.

La colocación de las muestras se ha hecho empleando un aplicador de 3-4 ml con una anchura de 16 mm.

La electroforesis se lleva a cabo durante 75 minutos, admitiendo la técnica un margen de error, en el tiempo, de —5 a más 10 minutos, aplicando un voltaje de 200 V.

Tras el desarrollo se procede a colorear con rojo ponçeau (0'5 g en 100 ml de ácido tricloroacético al 5 p. 100), durante cinco minutos.

La decoloración se efectúa por medio de 3-4 baños de ácido acético al 5 p. 100.

Una vez terminada la decoloración se transparentaron las tiras de la manera siguiente:

Las tiras decoloradas se sumergen primero en metanol puro anhidro durante 30 segundos como mínimo y a continuación en una solución compuesta de: Metanol, 85 ml; Acido acético, 14 ml y glicerina, 1 ml, durante un minuto como mínimo.

Se coloca sobre una placa de vidrio eliminando las burbujas de aire. Se calienta bajo lámpara de infrarrojos de 250 W situada a 5 ó 10 cm de distancia, durante unos minutos hasta transparencia completa.

Luego se invierte la placa de vidrio sobre una hoja de papel de filtro, dejándola enfriar durante 20 minutos como mínimo.

Las tiras obtenidas se pueden leer en el densitómetro.

### 5. Hierro sérico.

Fundamento. El hierro trivalente es fijado fuertemente por la transferrina, mientras que lo es en forma más débil en estado bivalente. Teniendo en cuenta esta peculiaridad, puede liberarse el hierro incubado con un agente reductor y una sustancia complejante, como es el derivado sulfonado de la 4,7-difenil-1,10-fenantrolina, con la que da un complejo coloreado que puede determinarse fácilmente por colorimetría.

### Reactivos.

- 1). Solución tampón de acetato pH 4,5.
- 2). Solución estabilizada 4,7 difenil— 1,10 fenantrolina sulfonada.
- 3). Acido ascórbico.
- 4). Solución patrón de hierro 1 g/ml.

### Técnica.

Seguir el siguiente esquema:

Tubo	1 Blanco de reactivos	2 Blanco de Suero	3 Patrón	4 Problema
Reactivo 1	—	2,00	—	—
Reactivo 2	2,00	—	2,00	2,00
H <sub>2</sub> O	1,00	—	—	—
Reductor	5 mg. (agitar los tubos)	5 mg.	5 mg.	5 mg.
Suero	—	1,00	—	1,00
Patrón Fe	—	—	1,00	—

Se mezcla bien y se deja 30 minutos a la temperatura ambiente. Leer en el fotocolorímetro a 535 m $\mu$ . ( $\pm$  5 m $\mu$ .), empleando H<sub>2</sub>O en la cubeta de referencia.

### *Cálculos.*

Los resultados se obtienen a partir de la siguiente operación:

$$H.S. = \frac{DO_4 - (DO_2 + DO_1)}{DO_3 - DO_1} \times 100 = \text{g Fe}/100 \text{ l.}$$

Do<sub>4</sub> = Densidad óptica de tubo problema

Do<sub>3</sub> = » » » patai

Do<sub>2</sub> = » » » blanco de suero

Do<sub>1</sub> = » » » blanco de reactivos

H.S. = Hierro sérico.

### 6. *Electroforesis de suero.*

Realizado en las mismas condiciones y con las mismas técnicas que para la electroforesis de hemoglobinas.

### 7. *Método electroforético en gel de almidón para albúminas.*

#### 7/1. *Tampones.*

El tampón puente empleado está formado por ácido bórico y sosa, tomados de las soluciones  $\frac{1}{2}$  molar y normal, en cantidades de 585,6 ml de bórico y 97,6 ml de sosa, completando con H<sub>2</sub>O destilada hasta 1.000 ml. Puede hacerse también tomando 18,55 g de ácido bórico y 4 g de sosa hasta un litro de H<sub>2</sub>O. El pH obtenido es 8,7.

El tampón gel está formado por tris-Cítrico, la cantidad de Tris es de 1,2190 g y la de cítrico 0,756 g. en 1.000 ml de H<sub>2</sub>O destilada. El pH obtenido es de 6,3. Aunque normalmente debemos incluir ClH al 0,4 p. 100, pues con las cantidades de Tris-Cítrico el pH es algo más alcalino. Hemos comprobado que para 250 ml de solución tampón gel, nos hace falta 1 ml de ClH al 0,4 p. 100 para bajar una décima el pH. También hemos empleado soluciones  $\frac{1}{2}$  molares de cítrico y Tris para obtener la solución tampón gel. Las cantidades empleadas son de 20,2 ml de Tris  $\frac{1}{2}$  molar y 7,4 ml de cítrico  $\frac{1}{2}$  molar para 1 litro de solución. Aunque el resultado es mejor si empleamos las cantidades pesadas para cada litro de tampón

#### 7/2. *Preparación del gel.*

La cantidad de almidón a emplear por 250 ml de tampón gel es de 35 g. Una vez pesado, se mezcla el tampón y el almidón en un Erlenmeyer, agitando fuertemente, a la vez que se coloca al fuego, durante un tiempo aproximado de 15 minutos; durante este tiempo el agitado debe

ser continuo, se retira cuando ha comenzado la ebullición. Es importante continuar el calentamiento después que la solución ha tomado un aspecto viscoso, hasta llegar a un estado mucho más líquido, que coincide con el comienzo de la ebullición.

A continuación se aparta de la llama, procediendo a la extracción del aire mediante una bomba de vacío. El gel es extendido a continuación sobre la placa procurando que la dirección del vertido sea seguida sin retrocesos. Sobre la placa se procede a colocar un cristal, y sobre éste unas pesas, dejando en reposo el gel durante 24 horas, hasta su utilización.

### 7/3. *Marcha de la electroforesis.*

Una vez transcurridas las 24 horas, desde la preparación del gel, procedemos a la inserción de las muestras. Mediante un bisturí se realiza un corte a 5 cm del borde del gel.

El papel utilizado para las muestras es wasman n.º 3 de dimensiones  $0,6 \times 0,6$  cm. En casos donde se necesita una mayor claridad en la resolución empleamos papel de  $1 \times 0,6$  cm. Cuando utilizamos muestras de  $0,6 \times 0,6$  cm, se colocan 10 por corte. Las muestras han sido previamente sumergidas en los distintos sueros a estudiar.

Una vez colocadas las muestras, se presiona el gel mediante una varilla de 0,6 cm. de ancho para mantener una mayor unión entre muestras y gel. La unión del gel a las cubetas que contienen la solución tampón puente se realiza mediante papel watman n.º 1.

El cátodo (polo—) se pone en contacto a 2 cm de la línea de inserción de las muestras, y el ánodo, a 2 cm del borde contrario a la inserción, mediante papeles de filtro. Una vez puesta en marcha la fuente de alimentación se mantiene a 25 mA, durante 5 minutos, hasta la retirada de las muestras; el corrido es de dos horas treinta minutos a tres horas 25 minutos. Se retira el gel cuando la línea de avance es de unos 9 cm.

### 7/4. *Coloración.*

Una vez retirada la placa, se procede a cortar los diferentes trozos horizontalmente en dos partes, mediante un hilo metálico lo suficientemente fino. Hemos utilizado para el corte la cuerda prima de guitarra, unida a los extremos de una segueta; la cuerda debe estar muy tensa para que el corte sea neto.

La coloración se realiza con una solución formada por 10 g de negro amido, 50 ml de ácido acético y 950 ml de H<sub>2</sub>O destilada, durante dos minutos.

#### 7/5. *Decoloración.*

La realizamos durante 24 horas, en una solución de acético al 2 p. 100. Previamente hemos lavado el colorante con agua. La decoloración es mucho mejor si frecuentemente se procede al cambio del decolorante. También hemos empleado en la decoloración una solución de metanol-agua-ácido acético, en proporciones 5: 5: 1. Esta decoloración es mucho más rápida, pues en una hora se ha logrado hacer visibles las diferentes fracciones. Pero el inconveniente que hemos constatado es la pérdida de nitidez por la contracción del gel.

#### 7/6. *Conservación.*

Se realiza en bolsas de plástico transparente que contienen ácido acético al 2 p. 100 y glicerina; esta última transparenta el gel, haciendo más visible las fracciones. También se procede a sacar fotografías de las placas para su archivo.

### 8. *Método electroforético en gel de almidón para transferrinas.*

#### 8/1. *Tampones.*

El tampón puente utilizado es el que hemos descrito ya con anterioridad, pues utilizamos el mismo, tanto para albúminas como para transferrinas.

El tampón gel está formado por tris-Cítrico. Las cantidades son: 2,272 g de Tris, y 1,124 g de Cítrico. En caso de no conseguir el pH 7,6 utilizamos soluciones de ClH, o NaOH, según se trate de bajar o subir el pH.

También hemos empleado soluciones ½ molares de cítrico y Tris para obtener la solución tampón gel. Las cantidades empleadas son 5,3 ml de cítrico ½ molar y 18,68 ml de Tris ½ molar, para 1 litro de solución.

#### 8/2. *Preparación del gel.*

Igual al apartado 7/2 del método para albúminas.

8/3. *Marcha de la electroforesis.*

La puesta en marcha es idéntica a la descrita con anterioridad. Las diferencias que apreciamos son las siguientes: las muestras son colocadas durante 30 minutos a 50 mA., el tiempo de recorrido es de 3 horas aproximadamente; procedemos a retirar la placa cuando la línea de avance alcanza los 11 cm.

8/4. *Coloración.*

8/5. *Decoloración.*

8/6. *Conservación.*

Apartados iguales en su contenido a los presentados con anterioridad para el método de albúminas.

### *Resultados*

#### *Hemoglobinas.*

En el cuadro I se exponen los resultados obtenidos en la raza objeto de estudio. Se expresan las frecuencias fenotípicas y genotípicas halladas así como las correspondientes al supuesto de equilibrio de Hardy-Weinberg; equilibrio que se ha probado mediante un test de  $\chi^2$  que no ha resultado significativo. Se incluyen igualmente las frecuencias génicas y las proporciones de homocigotos y heterocigotos.

#### *Transferrinas.*

En el cuadro II se expresan los mismos parámetros para esta otra fracción polimórfica. En esta ocasión la prueba ha resultado significativa a un alto nivel, lo que es indicativo de que la población, para este caso, no se encuentra en equilibrio genético. Este hecho podría responder a que hemos trabajado con una población no suficientemente grande, y que se haya producido un efecto del tamaño de la población, con la consiguiente deriva genética. Otra posible explicación podría estar en un efecto de la selección, que actuase por estar ligados los distintos tipos de transferrinas a algún carácter sometido a selección artificial; tal podría ser la tasa reproductiva.

CUADRO I. Frecuencias fenotípicas y genotípicas del polimorfismo hemoglobínico de la raza granadina. Frecuencias génicas.

	TIPO DE HEMOGLOBINA		
	AA	AB	BB
Frecuencias fenotípicas.	0,7667	0,2333	—
Frecuencias genotípicas en equilibrio	0,7804	0,2062	0,0136
	A.	B.	
Frecuencias génicas.	0,8834	0,1167	
Proporción de homocigotos	0,7667 p. 100		
Proporción de heterocigotos.	0,2333 p. 100		
Proporción homocigotos, estimación no viciada (Neil y col. 1973)	0,7905 p. 100		
idem heterocigotos.	0,2095 p. 100		
Varianza de la heterocigosis.	0,0035		
$\chi^2$ para equilibrio genético.	0,1864		

La desviación del equilibrio nos la confirma la comparación de las proporciones de homocigotos y heterocigotos obtenidos y las que corresponderían a la situación de equilibrio. Por otra parte, en este último caso, la frecuencia génica de un gen raro, como podría ser el C, debía ser la mitad aproximadamente de la frecuencia de los heterocigotos que lo portan, lo que no ocurre en nuestra población.

Es de señalar también la presencia de un individuo portador de la banda C, escasa en un gran número de razas.

#### *Albumina y potasio.*

Respecto a la albúmina, en la población estudiada, no se ha encontrado polimorfismo, perteneciendo todos los animales al genotipo SS.

Las frecuencias fenotípicas de los tipos de potasio eritrocitario han sido las siguientes: potasio alto = 16,67 p. 100; potasio bajo = 83,33 p. 100. En el cuadro III se exponen datos correspondientes a potasio de

CUADRO II. Frecuencias fenotípicas y genotípicas de transferrinas en la raza granadina. Frecuencias génicas.

	TIPO DE TRANSFERRINAS					
	AA	AB	AC	BB	BC	CC
Frecuencias observadas	0,2857	0,6786	0,0357	—	—	—
Frecuencias esperadas	0,4133	0,4363	0,0244	0,1151	0,0121	0,0003
	A	B	C			
Frecuencias génicas	0,6429	0,3393	0,0179			
Proporción homocigotos	0,2857 p. 100.					
Proporción heterocigotos	0,7143 p. 100.					
$\chi^2$ para equilibrio genético:	8,5866 p. 100.					

sangre total y potasio eritrocitario. Se incluyen estadísticos de los análisis realizados en la determinación del hierro sérico.

#### *Electroforesis de proteínas séricas.*

Los estadísticos obtenidos a partir de la densitometría de los electroferogramas realizados sobre papel se exponen en el cuadro IV. Se refieren a proteínas totales, albúminas, fracción alfa-1, alfa-2, alfa-3, beta-1, beta-2, beta-3, gamma-1 y gamma-2. Se incluye también datos de la relación albúminas/globulinas. En los casos necesarios se ha obtenido la incidencia de la presentación de la fracción de que se trata. Se observará la determinación, por parte nuestra, de fracciones que no se han considerado por otros autores.

En el cuadro V se indican los valores de las pruebas *t* realizadas con el fin de diferenciar, para cada una de las fracciones indicadas, la raza granadina con los datos correspondientes a las cabras de Texas, California y pura raza Saanen, obtenidos por Gorczyca y col. (1960). En la mayor parte de los casos, no han resultado significativas las diferencias.

CUADRO III. Valores estadísticos para los resultados de hierro sérico, y K. (HK. y LK.) eritrocitario y en sangre total.

Hierro sérico µg/100 ml.	HK. sangre total meq/100	LK. sangre total meq/1.000	HK. eritrocitos meq/1000	LK. eritrocitos meq/1.000	p. 100
W. 30,—	5,—	25,—	5,—	25,—	HK. 16,67
$\bar{X}$ 156,60	83,3559	16,6487	163,4480	29,4214	LK. 83,33
S. 59,6418	27,9821	8,6126	53,9211	15,3634	
ES. 10,8890	12,5140	1,7225	24,1143	3,0726	
t. 14,3814	6,6610	9,6652	6,7780	9,5751	
C. V. 0,3808	0,3356	0,5173	0,3298	0,5221	

CUADRO IV. Electroferograma sérico. Estadísticos. (Datos expresados en porcentajes).

Fracción Región	Media	Error media	Desviación típica	Coefficiente variabilidad	Incidencia
Proteínas totales	9,6169	0,6282	3,3831	0,3517	
Albúminas	50,0959	2,2763	12,2582	0,2446	
Alfa-1	5,3100	0,9125	4,7419	0,8930	100 p. 100
Alfa-2	7,2462	0,9140	4,1885	0,5780	72,41 p. 100
Alfa-3	5,2460	1,0082	2,2544	0,4297	17,24 p. 100
Beta-1	8,0072	0,8036	4,3274	0,5404	100 p. 100
Beta-2	5,4496	0,4666	2,3337	0,4281	86,21 p. 100
Beta-3	3,9950	1,1094	2,2189	0,5554	13,79 p. 100
Gamma-1	22,7186	1,5290	8,0911	0,3561	100 p. 100
Gamma-2	6,5200	1,6055	3,2111	0,4925	17,24 p. 100
Relación Albúmina/globulina	1,1390	0,1169	0,6293	0,5529	

CUADRO V. Pruebas *t* de diferencia entre distintas poblaciones para las diferentes fracciones.  
(Datos de Gorczyca y col. 1960 y nuestros)

Poblaciones	Proteínas totales	Albúminas	Alfa-1	Beta-1	Beta-2	Gamma
Texas y California.	0,0799(9)	5,4263(9)	0,9748(9)	0,5896(9)	—	3,3078(9)
Texas y Saanen	1,7212(6)	1,9275(6)	0,2990(6)	0,5647(6)	—	0,3432(6)
California y Saanen.	0,5253(7)	2,2697(7)	0,5952(7)	0,9740(7)	—	2,0596(7)
Granadina y Texas.	1,8741(32)	1,0039(32)	1,5578(30)	1,8462(32)	—	0,3278(31)
Granadina y California.	2,0290(33)	1,2561(33)	1,1868(31)	1,5884(33)	3,4035(29)	1,3680(32)
Granadina y Saanen.	1,3024(30)	0,0559(30)	1,0842(28)	1,8701(30)	—	0,0452(29)

Los números entre paréntesis indican los grados de libertad.

### *Asociación entre algunos polimorfismos.*

Mediante una tabla de contingencia, probada por  $\chi^2$ , se ha intentado determinar la posible asociación entre el tipo de potasio y el de hemoglobina, por una parte, y los fenotipos de hemoglobinas y transferrinas, por otra. En ningún de los dos casos ha resultado significativo, con valores muy próximos a cero. Esto concuerda con resultados obtenidos por nosotros, con anterioridad, en ovejas.

Se ha querido probar si existen diferencias en cuanto a los porcentajes obtenidos en el densitómetro, de las proteínas totales, de las albúminas y de las relaciones albúmina/globulina, entre los distintos tipos de hemoglobinas y de transferrinas. En el cuadro VI se exponen los resultados de las pruebas *t*. En ninguno de los casos ha resultado significativa. Igualmente se ha hecho para beta-1 y beta-2, resultando sólo significativa la diferencia entre la beta-2 para los distintos tipos de hemoglobinas.

Respecto al hierro sérico se han hecho las pruebas de diferenciación entre tipos de transferrina, que han resultado altamente significativas y entre tipos de hemoglobina, que no presentó significación.

### *Discusión*

*Hemoglobinas.* Tanto Tjankov (1972) como Efremov y Braend (1965) no encuentran polimorfismo hemoglobínico en las razas estudiadas, si bien estos últimos llegan a señalar que la única banda encontrada por ellos corresponde a la B de las ovejas. Osterhoff y Ward-Cox (1972) sí encuentran polimorfismo, con una alta frecuencia del gen A, que oscila entre 0,91 y 0,95 en las tres razas africanas consideradas, pero sin que llegue a encontrar diferencias significativas. En nuestro caso igualmente hemos encontrado polimorfismo con dos genotipos AA y AB; con una frecuencia génica de A igual a  $0.7667 \pm 0.0548$ .

Hay que tener en cuenta que los animales en consideración se encuentran a una altitud de 640 m. Ya Evans y col. (1957) y Efremov (1963) han señalado, en ovejas, la relación entre altitud y el tipo de hemoglobina con mayor afinidad por el oxígeno. Sin embargo, otros factores como origen, selección artificial, etc. pueden desviar esta relación.

En nuestro caso, por las circunstancias en que se explotan los animales, creemos que los factores citados pueden tener poca importancia.

El hecho de que la población se encuentre en equilibrio genético abogaría a favor de lo que se ha indicado últimamente.

Si consideramos la proporción de heterocigotos en las poblaciones en equilibrio igual a 2 veces la raíz cuadrada del producto de los homocigotos, para la población nuestra se ajusta bastante a lo esperado, ya que resulta igual a 0,2060. Si aplicamos la expresión para obtener una estimación no viciada de heterocigosis, según Nei y col. (1974) nos dará igual a 0,2095 y, de acuerdo con los mismos autores su varianza será 0,0035.

*Transferrinas.* Se ha de destacar, en primer lugar, la aparición en la población estudiada de una zona de transferrina tipo C. Si bien diferentes autores han señalado en las cabras la existencia de tres fenotipos con dos tipos de bandas A y B, Osterhoff y col. (1972) en razas africanas describen cuatro posibles bandas de transferrinas: A, B, C y D. Posteriormente Watanabe y Suzuki (1973) hallan exclusivamente las A, B y C en un conjunto de razas orientales.

En el cuadro III damos algunos datos genéticos de esta fracción. Los resultados obtenidos están próximos a los de Salerno y col. (1968) y a los de Watanabe y col. (1973), en cuanto se refiere a las frecuencias génicas; no así respecto a las frecuencias genotípicas, en las que se aprecia una mayor frecuencia de heterocigotos. Se ha señalado que aplicando la prueba  $\chi^2$  para la población en equilibrio, ésta ha dado significativa por causas que hemos comentado con anterioridad. Se detecta también un exceso de heterocigotos respecto a los que habría si la población estuviese en equilibrio. Este hecho puede deberse bien a la acción de la deriva genética, bien una frecuencia sexual diferente.

*Potasio y albúmina.* La población ha quedado diferenciada en dos grupos según los meq./l: uno con una cifra máxima de 55 aproximadamente y otro, potasio alto, que se inicia con una cifra de 76 meq./l. Las frecuencias obtenidas se aproximan a las de otros investigadores.

Todos los animales analizados pertenecen al mismo tipo de albúmina, SS. Si bien Salerno y col. (1968) dan cifras de frecuencias génicas de F. relativamente elevadas, Osterhoff y col. (1972) encuentran en algunas de

las razas estudiadas valores de la frecuencias génicas de F de 0,01 y 0,08, que están más en consonancia con la ausencia de este gen en nuestra población. De todas formas, volvemos a repetir la posible influencia del tamaño de la población sobre estos resultados.

Como se ha indicado con anterioridad se ha probado la posible asociación entre el nivel de potasio y el tipo de hemoglobina dando un valor de  $\chi^2$  igual a 0.1864, no significativo. Esta posible asociación ha sido probada en ganado ovino por distintos autores con resultados dispares; nosotros mismos nos hemos ocupado de ello sin encontrar relación; sin embargo, no se ha considerado en ganado caprino. Los datos que damos ahora pueden ser una primera aproximación al problema.

Se ha probado también la asociación de los tipos de hemoglobinas y transferrinas, con un  $\chi^2$  igual a 0,0009, no significativo.

*Electroforesis de proteínas séricas.* En nuestro trabajo se ha logrado una diferenciación de la fracción alfa en tres regiones, y las betas en otras tres, así como las gammas, en dos. Esto incrementa la precisión del análisis. Es necesario señalar que la población estudiada está constituida por animales del mismo sexo y edad aproximada, formando un grupo homogéneo de animales, porque Gorczyca y col. (1960) infieren que la raza y la edad influyen en algunas de las regiones. La incidencia de la región alfa-1 es de 100 p. 100, igual que en el trabajo de Gorczyca y col. citado. La alfa-2 es, sin embargo, mucho más frecuente en nuestro caso, ya que ellos sólo la encuentran, y en pocos casos, en las cabras de California. No incluyen la presentación de la región alfa-3, sí haciéndolo nosotros, que encontramos una incidencia de un 17,20 p. 100. Las frecuencias de las regiones beta-1 y beta-2 son aproximadas en los autores citados y en nuestros datos, aunque encuentran ellos diferencia entre razas para la beta-2. Nosotros volvemos a agregar una región más la beta-3 con una presentación de un 13,79 p. 100

La fracción gamma queda desdoblada en 2 regiones 1 y 2, presentándose la segunda en un 17,24 p. 100 de los casos.

La relación albúmina/globulina toma un valor muy próximo al que obtuvo A. Garrido (1967) en la raza serrana andaluza.

Hemos querido deducir la posible influencia de la raza en este conjunto de datos, comparando los resultados de Gorczyca y col. y los nuestros. Los valores de las pruebas *t* obtenidos se expresan en el cua-

dro V. Sólomente se han encontrado diferencias significativas en los siguientes casos: proteínas totales; entre raza granadina y cabras de California, con porcentaje de proteínas mayor en nuestra raza que en la otra de cabras. Albúmina: entre cabras de Texas y California, con inferioridad de los animales de California. Región beta-2: entre granadina y California, con media mayor de las cabras de California. Fracción gamma: entre Texas y California, media más elevada en las cabras californianas.

En el cuadro VI se exponen los resultados de las pruebas *t* que analizan las diferencias entre los distintos tipos de hemoglobinas y de transferrinas, de algunos de los análisis en la electroforesis sobre acetato de celulosa. De todas las pruebas realizadas sólomente han resultado significativas las que diferencian las regiones beta-2 respecto al tipo de hemoglobina y los niveles de hierro sérico de los distintos tipos de transferrinas. En el primer caso, mientras las hemoglobinas AB tienen un porcentaje medio de 8,31, las de tipo AA poseen una media de 4,90 p. 100. Respecto a las transferrinas, las AB alcanzan un nivel de hierro sérico de 172,26; y las AA, de 118,25 g p. 100 ml. Esto parece indicar que las transferrinas B tienen una mayor capacidad de fijación del hierro transportado.

CUADRO VI. Prueba *t* de diferenciación entre áreas de distintas regiones del electroferograma para los tipos de hemoglobina y transferrina.

	Hemoglobina Valores de <i>t</i>	Transferrinas Valores de <i>t</i>
Proteína total	0,3665(27)	0,6970(24)
Albúmina	1,8374(27)	0,4587(24)
Albúmina/globulina	1,8883(27)	0,7098(24)
Beta-1	0,2824(27)	0,1692(24)
Beta-2	3,0597**(23)	0,9778(20)
Hierro sérico	0,3850(28)	4,3222***(25)

### *Resumen*

Se ha estudiado una población de cabras hembras adultas de raza granadina, respecto a los polimorfismos de las hemoglobinas, transferrinas, albúminas, y niveles de potasio sanguíneo. Se incluyen datos de la electroforesis de proteínas séricas sobre acetato de celulosa y se dan los estadísticos de los niveles de hierro sérico, que presentan una media de  $156,60 \pm 10,89$  mg/100 ml.

Para las hemoglobinas se dan las frecuencias fenotípicas, las frecuencias génicas, las genotípicas en la situación de equilibrio genético y las proporciones de homocigotos y heterocigotos con las varianzas correspondientes, obtenidas según Nei y col. (1974). Se ha probado que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se dan los mismos parámetros genéticos para el polimorfismo transferrínico, para el que la población no se encuentra en equilibrio, debido al efecto del tamaño de la población, o a consecuencia de la selección por ligamiento con caracteres reproductivos. Se ha detectado transferrina tipo C en la población. Se aprecia un exceso de heterocigosis.

No se ha encontrado polimorfismo respecto a la albúmina, perteneciendo todos los animales al tipo SS.

Se aprecian dos niveles de potasio eritrocitario, por lo que se incluyen los porcentajes de potasio alto y bajo.

Se ha realizado un análisis de las proteínas séricas, dándose datos de: Proteínas totales, Porcentajes de albúminas, fracciones alfa-1, alfa-2, alfa-3, beta-1, beta-2, beta-3, gamma-1 y gamma-2. Se intenta inferir la influencia de la raza sobre estos datos, comparando los nuestros con los de Gorczyca (1960). Se ha encontrado diferencias en algunas razas en los siguientes grupos: proteína total, albúmina, región beta-2 y fracción gamma.

No se ha encontrado asociación entre el tipo de hemoglobina y el nivel de potasio; tampoco entre los tipos de hemoglobinas y los de transferrinas.

Se ha deducido que las hemoglobinas AB tienen un porcentaje más elevado de la región beta-2. Se ha deducido también que los animales de tipo AB de transferrinas tienen un más alto nivel de hierro sérico que los de tipo AA.

### *Resumé*

On a étudié une population de chèvres adultes appartenant à la race granadine, en rapport à son polymorphisme des hémoglobines, transferrines, albumines et niveaux de potassium sanguin. Ils y ont été enclus les données électrophoretiques des protéines sériques sur acetate de cellulose et aussi on donne les statistiques des niveaux de fer sérique lesquels présentent une moyenne de  $156,60 \pm 10,89$  mg/ml.

Pour les hémoglobines on donne les Fréquences phénotypiques, les génotypiques selon la situation d'équilibre génétique et les proportions d'homozigotes et d'heterozigotes avec les correspondantes variances obtenies d'après Nei et col. (1974).

Il a été prouvé que la population est en équilibre de Hardy-Weinberg.

On donne les mêmes paramètres génétiques pour le polymorphisme des transferrines, pour lesquels la population ne se trouve pas en équilibre, dû à l'effect de la grandeur de la population, ou comme conséquence de la selection par ligament avec des caractères reproductifs.

Il a été detecté la transferrine type C dans la population. On detecte aussi un excès d'hétérozigose.

On n'a pas apprécié de polymorphisme quant à l'albumine, appartenant tous les animaux au type SS.

Deux niveaux de potassium eritrocitaire ont été appréciés et suite de quoi, on y a enclus les pourcentages de HK et LK.

On a réalisé une analyse des protéines sériques, en ce qui concerne aux protéines totales, pourcentages d'albumine, fractions alpha 1, alpha 2, alpha 3, beta 1, beta 2, beta 3, gamma 1 et gamma 2.

On a essayé d'inferer l'influence de la race sur ces données en comparant nos resultats avec ceux de Gorczyca (1960).

On y a trouvé des differences avec quelques races parmi les groupes suivants: Proteines totales, albumine, région beta 2, fraction gamma.

On'y a pas trouvé d'association entre le type d'hémoglobines et les niveau de potassium, non plus entre le type d'hémoglobines et les transferrines.

Ona aussi déduit que les hémoglobines AB ont un pourcentage plus élevé de la région beta 2. Il a été déduit également que les animaux du type AB de transferrines ont une valeur plus élevée de fer sérique que ceux du type AA.

### *Agradecimientos*

Agradecemos al Centro de Cálculo patrocinado por la Caja provincial de ahorros de Córdoba, de la Facultad de Veterinaria, y a Don José María Roderó Franganillo, la colaboración prestada para el tratamiento estadístico de los datos.

Agradecimiento asimismo a Don Antonio Alcaide Mejías, propietario del rebaño estudiado.

### *Bibliografía*

- Ashton, G. C. y E. I. McDougall, 1958.—*Nature* 182: 945
- Bernhardt, D. 1964.—*Dt. Tierärztl. Wschr.*, 71: 461-462.
- Bouquet, Y. y A. E. R. Willems, 1971.—*An. med. vet.* 115: 335-389.
- Cabannes, R. y C. Serain, 1955.—*Seanc. Soc. Biol.* 149: 7-10.
- Cavalli-Sforza, L. L. y W. F. Bodmer, 1971.—*The genetics of human populations*. W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- Efremov, G. 1963.—*Thehs. University of Belgrad*.
- Efremov, G. y M. Braend, 1965.—*Proc. 9th Europ. Conf. Anim. Blood Groups: Prague, 1964.* 313-320.
- Evans, J. V., H. Harris y F. L. Warren, 1957.—*Biochem. J.* 65: 42.
- Evans, J. V. y A. T. Phillipson, 1957.—*J. Physiol.*, 139: 87-96.
- Garrido, A. 1967.—*Tesis doctoral. Universidad de Sevilla*.
- Garzón, R. 1975.—*Tesis doctoral. Universidad de Córdoba*.
- Gorczyca, L. R., R. T. McCarty y J. M. Limon 1959.—*Am. J. Vet. Res.* 78: 921-924.
- Gorczyca, L. R., R. T. McCarty y J. A. Lazaroni, J. A. 1960.—*Am. J. Vet. Res.* 21: 851-855.
- Huisman, T. N. J., J. B. Wilson y H. R. Adams, 1967.—*Arch. Biochem. Biophys.* 121: 528-530.
- Li, C. C. 1962.—*Population Genetics. The University of Chicago Press*.
- Nei, M. y A. K. Roychoudhury, 1974.—*Genetics*, 76: 379-390.
- Salerno, A., N. Montemurro, y A. L'Affitto, 1970.—*Proc. XIth Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorph. Varsovia. 1968:* 517-520.
- Osterhoff, D. V. e I. S. Ward-Cox, 1972.—*Proc. XIIth Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorph. Budapest. 1970:* 579-582.

- Rasmusen, B. A. y J. G. Hall, 1966.—Proc. Xth. Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorph. Paris. 1966. 453-457.
- Suzuki, S. y S. Watanabe, 1970.—Proc. XIth. Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorph. Varsovia. 1968: 513-515.
- Tjankov, S. 1972.—Proc. XIIth. Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorph. Budapest. 1970. 575-578.
- Tucker, E. M. y J. C. Ellory, 1972.—Proc. XII th. Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochen. Polymorph. Budapest. 1970. 557-559.
- Watanabe, S. y col. 1965.—Proc. Japan. Acad. 41. 326.
- Watanabe, S. y S. Suzuki, 1973.—Anim. Blood Groups Biochem. Genet. 4: 23-26.
- Peers, F. G. 1962.—W. Afr. J. Biol. Chem. 6: 9-10.