

POLIMORFISMO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA COLINESTERASA
PLASMÁTICA (ChE) EN POLLOS.

(GENETIC POLYMORPHISM AND ENZYMATIC ACTIVITY OF THE PLASMA
CHOLINESTERASE (ChE) IN CHICKENS).

J. Martínez Hens, A. I. Garzón Sigler, R. Garzón y A. Rodero

Instituto de zootecnia (C.S.I.C.). Sección de grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos. Facultad de veterinaria. Córdoba (España).

Palabras clave: Bioquímica avícola. Colinesterasa, Polimorfismo. Enzimas. Pollos.

Keywords: Biochemistry. Cholinesterase. Polymorphism. Enzymes. Poultry. Chicken.

Summary.

Four cholinesterasic phenotypes in the blood plasma of chickens were identified. The technique of horizontal electrophoresis on polyacrylamide gel was used. These phenotypes also found by Csuka and Petrovsky (1968) and Alvarez del Valle (1981), are designated as A, B, AB and O.

The quantification of the cholinesterasic activity was done by spectrophotometric techniques. While quantifying the cholinesterasic activity, significant differences between the mean values of each phenotype were recorded. The main activity corresponded to the most anodic band A, while the phenotype O characterized by a lack of bands showed the minimum cholinesterasic activity. We found heterosis for this trait.

Resumen.

Se han identificado cuatro fenotipos colinesterásicos en plasma sanguíneo de pollos. Para ello se han utilizado técnicas de electroforesis

Recibido: 8-11-88. Aceptado: 25-1-89.

horizontal sobre gel de poliacrilamida. Dichos fenotipos, que coinciden con los descritos por Csuka y Petrovsky (1968) y Álvarez del Valle (1981), son designados por A, B, AB y O.

Mediante técnicas espectrofotométricas se ha cuantificado la actividad colinesterásica plasmática de estos animales, y se han encontrado diferencias significativas entre los cuatro fenotipos. La mayor actividad corresponde a la banda de migración más anódica (A), mientras que el fenotipo carente de banda electroforética (O) presenta la mínima actividad colinesterásica. Se ha observado el fenómeno de heterosis para este carácter.

Introducción.

El estudio de la relación entre el polimorfismo bioquímico en aves y la intoxicación por compuestos organofosforados (OPs) ha constituido la tesis doctoral de uno de los autores (1988), lo que nos llevó a estudiar previamente el polimorfismo esterásico en pollos y la relación de tal polimorfismo con la actividad enzimática correspondiente, concretándonos al grupo de las colinesterasas, enzimas muy sensibles a los OPs.

La variabilidad genética y los cambios fisiológicos de las estererasas en pollos fueron descritos por primera vez por Tanaka y Nakaso (1959); trabajo continuado por Kaminski y Jeanne-Rose (1964) y Borel (1964).

El conjunto de investigaciones posteriores no clarifican, de una manera definitiva, el sistema genético de control de las estererasas plasmáticas en pollo. Así, mientras Csuka y Petrovsky (1968) y Álvarez del Valle (1981) proponen la existencia de un locus autosómico con tres alelos: EsA, EsB y EsO; los dos primeros codominantes entre sí y dominantes ambos sobre el alelo EsO; Kimura (1969) se inclina por la presencia de dos alelos codominantes (Es-F y Es-S) y, por último, Grunder (1971) propone un sistema genético en el que el control esterásico estaría regulado por un locus autosómico con tres alelos codominantes: EsA, EsB y EsC.

Material y métodos.

Se han utilizado 97 pollos de raza Rhode Island, recogidos con 7 días de edad y mantenidos en condiciones de laboratorio hasta los 4 meses, a fin de controlar aquellos factores ambientales (alimentación, temperatura,

estrés, etc.) que pudieran influir en la cuantificación de su actividad colinesterásica. Los animales eran todos del mismo sexo (machos) y edad (4 meses).

De cada animal se ha obtenido una muestra de sangre, que se ha sometido a centrifugación a 2000 g durante 15 minutos en centrífuga refrigerada. El sobrenadante se ha conservado en tres alícuotas a -30°C .

Una de ellas fue utilizada para identificar, mediante técnicas de electroforesis horizontal, las distintas variantes colinesterásicas. Otra permitió cuantificar la actividad colinesterásica del animal, mediante técnicas espectrofotométricas. La última quedó como material de reserva, para posibles repeticiones de pruebas.

El método electroforético utilizado (pH 8,5) ha sido el descrito por Gahne y col. (1977).

Para la identificación de las zonas de actividad colinesterásica se han establecido dos criterios complementarios: movilidad electroforética (Augustinsson, 1961) e inhibición por eserina 10^{-5}M (Krish, 1971).

El método elegido para cuantificar la actividad colinesterásica ha sido el de Ellman y col. (1961), si bien se ha introducido una pequeña modificación recomendada por Szasz (1968) en cuanto al substrato utilizado. Este autor indica que la afinidad de la colinesterasa por la butiriltiocolina (substrato utilizado por nosotros) es dos veces superior a la que muestra por la acetiltiocolina (substrato utilizado por Ellman y col. 1961). Además, la butiriltiocolina presenta una mayor estabilidad que la acetiltiocolina al pH y a al calor.

Resultados y discusión.

Se han identificado cuatro fenotipos colinesterásicos en el plasma sanguíneo de las muestras de pollos utilizados. Siguiendo el método propuesto por Csuka y Petrovsky (1968), se han designado a estos cuatro fenotipos por las letras A, B, AB y O. Los fenotipos A y B están representados por bandas de igual grosor y teñidas con igual intensidad, si bien la banda designada como A tiene mayor movilidad electroforética que la B. Los heterocigotos AB presentan ambas bandas y los AO y BO aparecen en el zimograma de idéntica forma que los homocigotos AA y BB, respectivamente (fig. 1).

En algunos animales incluidos en los fenotipos A y B es posible observar variaciones en la intensidad de tinción de las bandas y, a veces, en el grosor de las mismas. Como otros autores (Oki y col., 1966), pensa-

mos que estas diferencias en intensidad de tinción podrían corresponder a las existentes entre los animales homocigotos (AA y BB) y los heterocigotos (AO y BO).

Los animales incluidos en el fenotipo O no ostentan ninguna banda que los identifique, por lo que "aparentemente" no presentan actividad colinesterásica en plasma.

Suponiendo la población en equilibrio de Hardy-Weinberg se han obtenido las frecuencias génicas y genotípicas que, junto a las fenotípicas encontradas, se exponen en la tala I.

La prueba ji-cuadrado, que valora el ajuste entre el número de individuos observado para cada clase fenotípica en la muestra y el esperado, asumiendo una situación de equilibrio Hardy-Weinberg, revela un valor de 9,26, el cual es significativo ($p < 0,05$). Ello viene a indicar que, en lo referente a los fenotipos, existe un desequilibrio en la población, que podría deberse primordialmente a un exceso de heterocigotos AB. Recordemos que, para este carácter, estos heterocigotos presentan mayor actividad colinesterásica que los homocigotos, lo cual va acompañado de una alta resistencia a los compuestos organofosforados, como se demuestra en nuestros trabajos previos (Martínez et al., 1968a y 1988b).

Posteriormente se determinó la actividad colinesterásica media de cada fenotipo, y se obtuvieron los resultados expuestos en la tabla II.

La prueba F de Snedecor (1964) muestra diferencias significativas ($F=317,7$; $p < 0,01$) en el total de fenotipos, respecto de sus actividades enzimáticas. Estas diferencias apuntan a una clara correspondencia entre el carácter cuantitativo de una mayor o menor actividad enzimática. Dentro de esta correspondencia debemos resaltar varios puntos: a) el fenotipo A presenta una actividad mucho mayor (más de un 230 p.c.) que el fenotipo B. b) El fenotipo O presenta la menor actividad colinesterásica de los cuatro fenotipos existentes. c) El fenotipo AB confiere una actividad aún mayor de la que cabría esperar de la suma de las actividades de los fenotipos A y B.

Estas consideraciones nos llevan a apuntar la posibilidad de que las distintas enzimas o subunidades enzimáticas, manifestadas por distintas bandas en el zimograma, sean las responsables de una mayor o menor actividad enzimática. Los animales de fenotipo AB parecen verse favorecidos por heterosis, lo cual les confiere una alta actividad colinesterásica y una mayor resistencia frente al grupo de los pesticidas organofosforados (1988).

La imposibilidad de detectar electroforéticamente (con los substratos y técnicas empleados) una colinesterasa plasmática en los animales homocigotos recesivos para este locus colinesterásico, parecía, en principio,

reflejar la no expresión del alelo Es0 o que la enzima o fracción enzimática resultante fuera inactiva.

Casos similares de alelos silenciosos han sido publicados por varios autores, entre otros, Okada y Sasaki (1970); Tanabe e Ise (1972) y Hashiguchi y col. (1981). Asimismo, Liddell y col. (1962) postulan la existencia de un gen silencioso (Es¹) causante de la ausencia total de actividad colinesterásica en el hombre. En un principio, sosteníamos la existencia de una gran similitud entre dicho alelo y Es0, en pollos.

Sin embargo, al cuantificar la actividad colinesterásica de estos homocigotos, obtenemos unos valores medios que, si bien son mínimos, descartan al mismo tiempo la inexpressión del alelo Es0 y la inactividad del producto enzimático sintetizado.

Este hecho nos lleva a plantear la posibilidad de que la no detección electroforética de estos homocigotos recesivos esté originada por la mínima actividad colinesterásica que presentan (alrededor de 35-40 mU/ml/min.); nivel por debajo del cual dicha actividad no sería detectable electroforéticamente. Esta hipótesis ha sido, sin embargo, descartada por nosotros anteriormente (1988).

Nuestros resultados están, por tanto, en contradicción con las opiniones de Csuka y Petrovsky (1968) y Álvarez del Valle (1981), quienes designan a los animales pertenecientes al fenotipo 0 como de "actividad esterásica negativa".

Descartada la presencia de un nivel crítico de actividad colinesterásica por debajo del cual dicha actividad no sería detectable, nos inclinamos a aceptar la existencia de diferencias cualitativas entre los productos enzimáticos codificados por los distintos alelos. Así, la enzima o subunidad enzimática codificada por el alelo Es0 puede presentar unas características bioquímicas que provocan, bajo las técnicas y substratos utilizados, su no manifestación en el zimograma. Así mismo, las acusadas diferencias de termoestabilidad que presentan algunas isozimas podrían explicar igualmente la no detección electroforética de la actividad colinesterásica plasmática de los animales pertenecientes al fenotipo 0.

Bibliografía.

- Álvarez del Valle, A. 1981. Estudio genético de isozimas en pollos. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. España.
Augustinsson, K.B. 1961. Multiple form of esterase in vertebrate blood plasma. Ann. N.Y. Acad. Sci. 94: 844-860.

- Bernstein, F. 1930. Fortgesetzte Untersuchungen aus der Theorie der Blutgruppen. Z. indukt. Abstamm. VererbLehre 56: 233-273.
- Borel, J.F. 1964. Recherches immuno-génétiques sur les substances spécifiques de groupes chez la poule et sur leur utilisation comme marqueurs de gènes dans l'élevage. Tesis doctoral. Zurich.
- Csuka, J. y Petrovsky, R. 1968. Study of polymorphism of esterase of chicken-egg white and blood serum. Fol. Biol. 14: 165-168.
- Ellman, G. L., Courtney, K.D., Andres, V.J. y Feather-Stone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of cholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7: 88-95.
- Gahne, B., Juneja, R.K. y Grolmus, J. 1977. Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in blood plasma of cattle. Anim. Blood Grps. biochem. Genet. 8: 127-137.
- Grunder, A.A. 1971. A third allele of serum esterase in domestic fowl and strain distribution of six phenotypes. Anim. Blood biochem. Genet. 2: 189-194.
- Hashiguchi, T., Yoshida, R., Maeda, Y. y Taketomi, M. 1981. Genetic variations of serum esterase isozymes (Es-5, Es-6 and Es-7) in the Japanese quail. Bull. Fac. Agric. Kagoshima. 31: 67-74.
- Kaminski, M. y Jeanne-Rose, M. 1964. Esterases in avian sera: species specific patterns and individual variation. Experientia 20: 286-289.
- Kimura, M. 1969. Genetic studies on plasma esterase isozymes in chicken. Jap. Poult. Sci. 6: 68-72.
- Krish, K. 1971. Carboxylic ester hydrolases. En: Boyer, P.D. (ed.). The enzymes. 3ª ed. Acad. Press N.Y. 43-70.
- Liddel, J., Lehmann, H. y Silk, E. 1962. A "silent" pseudocholinesterase gene. Nature 193: 561-562.
- Martínez Hens, J. 1988. Relación entre el polimorfismo bioquímico animal y la intoxicación experimental por insecticidas organofosforados. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba (España).
- Martínez Hens, J., Garzón Sigler, A.I., González, J.M. y Rodero, A. 1988. Relación del polimorfismo y actividad colinesterásicos con la resistencia a compuestos organofosforados en pollos. (Pendiente de publicación).
- Okada, I. y Sasaki, S. 1970. Genetic control of liver esterase forms in chickens. Anim. Blood Grps. biochem. Genet. 1: 181-188.
- Oki, Y., Takeda, M., Manda, M. y Nishida, S. 1966. Genetic and physiological control of esterases in experimental small animals. I. Inheritance of serum esterase in mice. Tohoku J. Agric. Res. 17: 51-56.

- Szasz, G. 1968. Cholinesterase-Bestimmung in Serum mit Acetyl und Butyrylthiocolin als Substrat. Clin. Chim. Acta 19: 191-204.
- Tanabe, Y e Ise, T. 1972. Inheritance of electrophoretic variants of liver esterases in the chickens. Japan. J. Genet. 47: 257-263.
- Tanaka, K.R. y Nakaso, . 1959. Multiple forms of chicken esterases. Vox Sang. 16: 514-516.
- Snedecor, G.W. y Cochran, W.G. 1964. Métodos estadísticos. Compañía ed. Continental S.A.

Fig.1. Zimograma de la colinesterasa plasmática en pollos.
(+ ánodo; - cátodo; → punto de contacto)

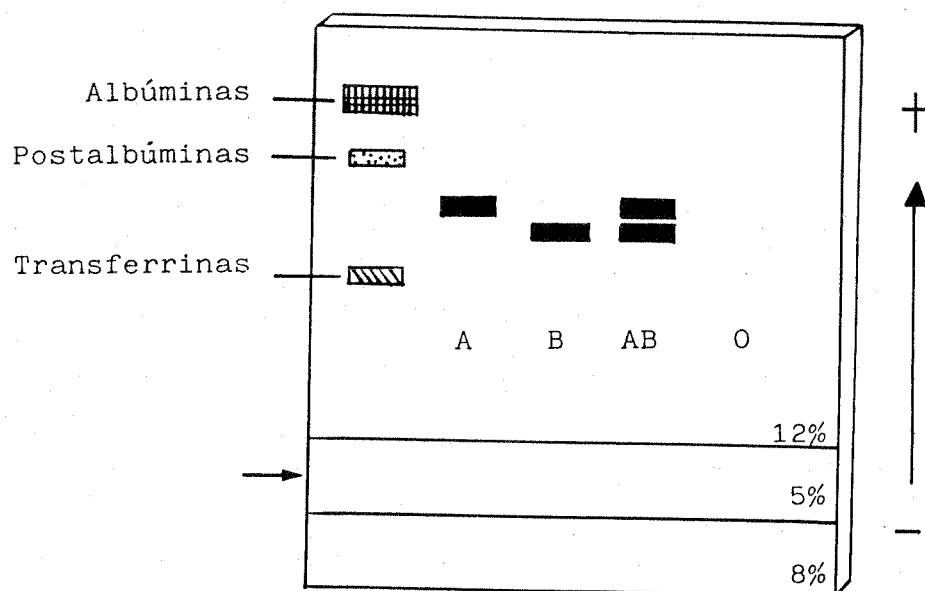


Tabla I. Distribución de los fenotipos en la población analizada, distribuciones genotípicas y frecuencias génicas en la situación de equilibrio.

Fenotipos	Nº de individuos observados	Genotipos	Frecuencias		
			fenotípicas observadas	genotípicas en equilibrio	génicas en equilibrio
A	19	AA	0.196	0.087	A(p)= 0.295
		AO		0.183	
		BB		0.156	
B	32	BO	0.330	0.245	B(q)= 0.395
		AB		0.233	
O	14	OO	0.144	0.096	O(r)= 0.310

Nota: Frecuencias calculadas según el método de Bernstein (1930).

Tabla II. Actividad colinesterásica media de los cuatro fenotipos.

Fenotipo	Nº de animales	Activ.ChE media (mU/ml/min.)	Error de la media
A	19	127.012	8.279
B	32	54.553	3.211
AB	32	228.713	14.206
O	14	31.832	4.588