

RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE METALES (Fe, Cu, Zn) Y DIFERENTES POLIMORFISMOS SERICOS EN EL CABALLO ESPAÑOL.

(RELATIONSHIP BETWEEN METAL CONCENTRATION (Fe, Cu, Zn) AND DIFFERENT SERUM POLYMORPHISMS IN THE SPANISH HORSE).

por

Angela Moreno, Ana I. Garzón, L. Morera, R. Garzón y D. de Andrés

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

Palabras clave: Genética. Bioquímica. Producción animal. Veterinaria. Albúmina. Esterasas. Transferrina.

Keywords: Genetics. Biochemistry. Animal production. Veterinary Science. Albumin. Esterases. Transferrine.

Summary

The blood serum concentration of the metals Fe, Cu, and Zn has been studied in a population of sixty Spanish horses, as well as the genetic polymorphisms of albumin (Al), transferrine (Tf) and alkaline esterase (Est-al) and acid (Est-ac).

With the data obtained, the elementary analysis of quantitative characteristics is carried out (metal concentration: Fe, Cu, Zn). The differences between the metal concentration and each of the polymorphisms studied is determined through variance analysis to infer possible relationships.

The  $\chi^2$  equilibrium for different polymorphisms is also obtained and the heterozygosis is calculated for each locus as well as for the population as a whole.

Resumen

Se ha estudiado una población de 60 caballos españoles, la concentración en suero sanguíneo de metales Fe, Cu y Zn, así como los polimorfismos genéticos de albúmina, esterasa ácida y alcalina y transferrina.

Recibido para publicación el 30-1-1983.

Con los datos obtenidos se realiza el análisis estadístico elemental de los caracteres cuantitativos (concentración de los metales). Se determina la diferencia entre la concentración de metal y cada uno de los polimorfismos, mediante análisis de varianza, para inferir posibles relaciones. Se obtiene el  $X^2$  de equilibrio para los diferentes polimorfismos y se calcula la heterozigosis para cada locus así como para el conjunto de la población.

### Introducción

El metabolismo de los oligoelementos está íntimamente relacionado con el mantenimiento del crecimiento y desarrollo normales, así como de la reproducción y sanidad animales. Un gran número de desordenes clínicos en animales domésticos está asociado a deficiencias de estos oligoelementos. Durante las dos últimas décadas una gran cantidad de información ha sido obtenida sobre el papel desempeñado por estos elementos en el mantenimiento de las funciones metabólicas normales y sobre las consecuencias de su deficiencia o exceso. Revisiones amplias a este respecto han sido publicadas por Underwood (15,16).

Asociaciones entre concentración de metales y fenotipos de sistemas polimórficos han sido citados por Wiener y Field<sup>17)</sup>, quienes presentaron evidencia de variación genética en la concentración de un número de minerales en la sangre, tanto de ovinos como de vacuno.

Por lo que respecta a ovinos, se ha encontrado que las ovejas de hemoglobina B poseen concentraciones de cobre en sangre total mayores que las ovejas del tipo A. El tipo AB presenta concentraciones intermedias entre ambos (Wiener *et al.*<sup>18)</sup>). El polimorfismo de albúmina en caballos fue mostrado, en primer lugar, por Braend<sup>2)</sup> y Bengtsson y col.<sup>1)</sup>.

Se detectan tres fenotipos, denominados F, FS y S, que, según los datos obtenidos por estos autores, están controlados genéticamente por un locus autosómico con dos alelos codominantes S y F.

El sistema transferrina en caballos fue estudiado, en principio, por Braend y Stormont<sup>3)</sup>, quienes propusieron la existencia de seis alelos codominantes, a los que denominaron D, F, H, M, O y R. Investigaciones posteriores (Hasselhot<sup>7)</sup>; Bengtsson y col.<sup>1)</sup>; Kaminsky y col.<sup>9)</sup>) confirmaron este supuesto. Ghane<sup>6)</sup> mostró la variación dentro de una zona de esterasa, que identificó como carboxilesterasa. Encontró siete fenotipos, a los que denominó F, I, S, O, FI, FS e IS. Los fenotipos F, I y S poseen tres bandas. El fenotipo O se caracteriza por la

ausencia de bandas. Los fenotipos FI y FS tienen cuatro bandas; y el fenotipo FS, cinco. La herencia de este sistema es mediante tres alelos autosómicos codominantes, F, I y S, y un cuarto recesivo (0).

Scott<sup>12)</sup>, empleando un sistema de baja fuerza iónica, a pH 4'5, consiguió una separación mejor de las esterases polimórficas. Mediante este método detectó tres nuevas bandas: la banda G (situada en la zona del alelo F, a pH alcalino); la banda H (situada en la zona del alelo I) y la banda X (situada en posición posterior a la banda I).

El propósito del presente trabajo es la determinación de las concentraciones de tres metales: Fe, Cu y Zn, en suero de caballos; el estudio de cuatro sistemas polimórficos y el estudio de los valores medios de las concentraciones de los metales citados en cada uno de los genotipos de estos sistemas, para detectar posibles diferencias entre ellos. Los sistemas polimórficos estudiados han sido: albúminas, esterases ácidas y alcalinas y transferrinas.

#### Material y métodos

Las muestras analizadas en el presente trabajo han sido obtenidas de la agrupación de caballos del 7º Depósito de Sementales, en Córdoba. La detección de los distintos genotipos en los sistemas polimórficos se ha realizado mediante electroforesis en gel de almidón, según los métodos siguientes: albúmina y transferrina: Kristjansson (1963), modificado por Efremov y Braend<sup>4)</sup>. Esterasa ácida: Scott<sup>12)</sup>. Esterasa alcalina: Smithies<sup>13)</sup>, modificada por Ghane<sup>5)</sup> y adaptada por Kaminsky<sup>8)</sup>.

La determinación de las concentraciones de Fe, Cu y Zn presentes en los sueros sanguíneos se ha llevado a cabo por espectroscopía de absorción atómica, midiendo directamente en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 380, haciendo uso de las correspondientes lámparas de cátodo hueco, a las siguientes longitudes de onda: Fe, 248,3; Zn, 213, 9; y Cu, 324,8.

#### Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en las determinaciones de las concentraciones de metales se representan en la figura 1. En ella se muestran los histogramas de frecuencias absolutas correspondientes a las distribuciones de cada uno de los metales, así como los parámetros estadísticos más usuales de cada una de ellas.

En cuanto a la forma de estas distribuciones, aunque evidentemente no es estrictamente normal, a la vista de los valores de los coeficientes de asimetría y curtosis ( $g_1$  y  $g_2$ , respectivamente) podemos afirmar que esta desviación de la normalidad no puede considerarse significativa a efectos estadísticos. El número de muestras estudiadas no es grande (inferior a 100), lo que hace no aconsejable la realización de una prueba  $\chi^2$  de bondad de ajuste.

El rango de distribución de los valores es el siguiente: 3,10 - 0.57  $\mu\text{g/ml}$ , con un valor medio de 1,53 y una desviación típica de 0.609, para el Fe; 1,20 - 0.44  $\mu\text{g/ml}$ , con  $\bar{x} = .77$  y  $s = 0.187$ , para el Cu; y finalmente, 1,23 - 0.26  $\mu\text{g/ml}$ , con  $\bar{x} = 0.59$  y  $s = 0.210$ , para el Zn.

En la tabla I se muestran los resultados obtenidos en los análisis de los sistemas polimórficos estudiados: albúmina, esterasas ácidas y alcalina y transferrina.

Esta figura ofrece, además del número de muestras estudiadas para cada sistema, los valores de las frecuencias genotípicas observadas (en valores absolutos) y las frecuencias génicas. A partir de los valores de éstas se han calculado los valores de las frecuencias genotípicas esperadas. En el caso del polimorfismo de albúmina se ha calculado el  $\chi^2$  de ajuste, para determinar la existencia de equilibrio Hardy-Weinberg y, como puede observarse, no es significativo.

Para los demás polimorfismos no se ha efectuado el cálculo de este  $\chi^2$  de ajuste para el equilibrio Hardy-Weinberg, dada la presencia de gran número de valores de las frecuencias esperadas inferiores a 5; sin embargo, puede observarse una amplia concordancia entre los valores de las frecuencias observadas y esperadas en todos los casos, lo que significaría la existencia de equilibrio Hardy-Weinberg, también para estos loci.

Hemos investigado la posible existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de las concentraciones de metal y suero para cada uno de los metales y para los cuatro sistemas polimórficos. El método estadístico empleado ha sido el análisis de varianza simple, mediante el cual se forman grupos de observaciones correspondientes a cada uno de los genotipos en cada uno de los sistemas (tres, en el caso de las albúminas; seis, en el caso de las esterasas alcalinas y ácidas; y doce, en el caso de las transferrinas) y se contrasta la hipótesis de igualdad de medias para cada uno de estos grupos así formados.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla II. En la parte izquierda se muestran los valores F obtenidos en el análisis de varianza

correspondiente a cada uno de los casos; y en la parte derecha, el valor teórico de la distribución F, para un nivel de significación del 5 p.100, para determinar la significación de los valores F observados, así como los correspondientes grados de libertad.

A la vista de los resultados obtenidos, en los que ninguno de los valores F es significativo, podemos concluir la no existencia de diferencias entre los valores medios de las concentraciones de Fe, Cu y Zn, en el suero de caballos, para los distintos genotipos, en los sistemas polimórficos de albúminas, esterasas ácidas, esterasas alcalinas y transferrinas.

Se ha calculado el valor de la heterocigosidad por locus (h), así como la heterocigosidad media (H) para los cuatro loci estudiados. Se han utilizado dos métodos: el conteo directo de heterocigotos, lo cual es posible dada la existencia de codominancia en todos ellos; y, en segundo lugar, el cálculo a partir de los valores de las frecuencias génicas obtenidas, siguiendo a Nei & Roychondhury<sup>10</sup>.

Si llamamos  $x_i = \sum n_i/n$  a la frecuencia muestral del alelo i y asumiendo que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, la homocigosidad y heterocigosidad muestral viene dada por  $j_x = \sum_{k=1}^r x_k^2$  y  $h = 1 - j_x$ , respectivamente.

La heterocigosidad media de una población, definida como el valor medio de h para todos los loci, se estima mediante

$$\hat{H} = \sum_{k=1}^r h_k / r$$

donde r es el número de loci estudiados y  $h_k$  la estimación de la heterocigosidad para el k-ésimo locus.

La varianza de muestreo de  $\hat{H}$  se obtiene mediante la expresión

$$V(\hat{H}) = V(h)/r$$

en la cual V(h) es la varianza de la heterocigosidad para los diferentes loci, que puede ser estimada por

$$V(h) = \sum_{k=1}^r (h_k - \hat{H})^2 / (r-1).$$

En la tabla III se presentan los valores obtenidos en la población de caballos estudiada por nosotros, para la heterocigosidad por locus y media, así como los valores de las respectivas varianzas. Puede observarse cómo es el sistema transferrínico el que presenta mayor proporción de heterocigotos (0.672), mientras que los tres restantes sistemas poseen valores situados en torno al 50 p.100. La heterocigosidad promedio  $\hat{H}$  ha resultado ser de 0.551, con una varianza estimada de 0.002.

Tabla I. Frecuencias genotípicas y génicas en los sistemas analizados.

SISTEMA	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS						FRECUENCIAS GÉNICAS					
	SS	SF	SI	FF	FI	II	S	F	M	R		
Albúmina n=49	obs. 13	22		14								
	esp. 11'7	24'5		12'8			0'49	0'51				
				$\chi^2 = 0'506$ n.s.)								
Esterasa alcalina n=50	obs. 1	1	1	8	15	24						
	esp. 0'1	1'3	2'6	5'1	20'5	20'5	0'04	0'32		0'64		
Esterasa ácida n=38	obs. 3	1	7	4	6	17						
	esp. 1'3	2'8	8'6	1'5	9'3	14'5	0'18	0'19		0'63		
Transferrina n=48	obs. 2	14	3	2	8	3						
	esp. 4'1	13'4	2'0	2'3	11'0	3'3	0'29	0'48	0'07	0'08	0'04	0'02
	FM	FO	FR	HM	MO	SR	D	F	H	M	O	R
	obs. 5	2	1	1	1	1						
	esp. 3'8	1'9	1'0	0'6	0'1	0'2						

Tabla II. Valores F obtenidos en el análisis de la varianza simple, para comparar valores medios de la concentración de metal en los diferentes fenotipos de los sistemas polimórficos estudiados.

SISTEMA	METAL			F	g.l.
	Fe	Cu	Zn		
Albúmina	1.489	0.289	2.323	3.18	2; 46
Esterasa alcalina	0.904	1.189	1.105	2.45	5;44
Esterasa ácida	1.549	0.843	1.013	2.53	5;32
Transferrina	0.588	0.688	0.635	2.08	11;36

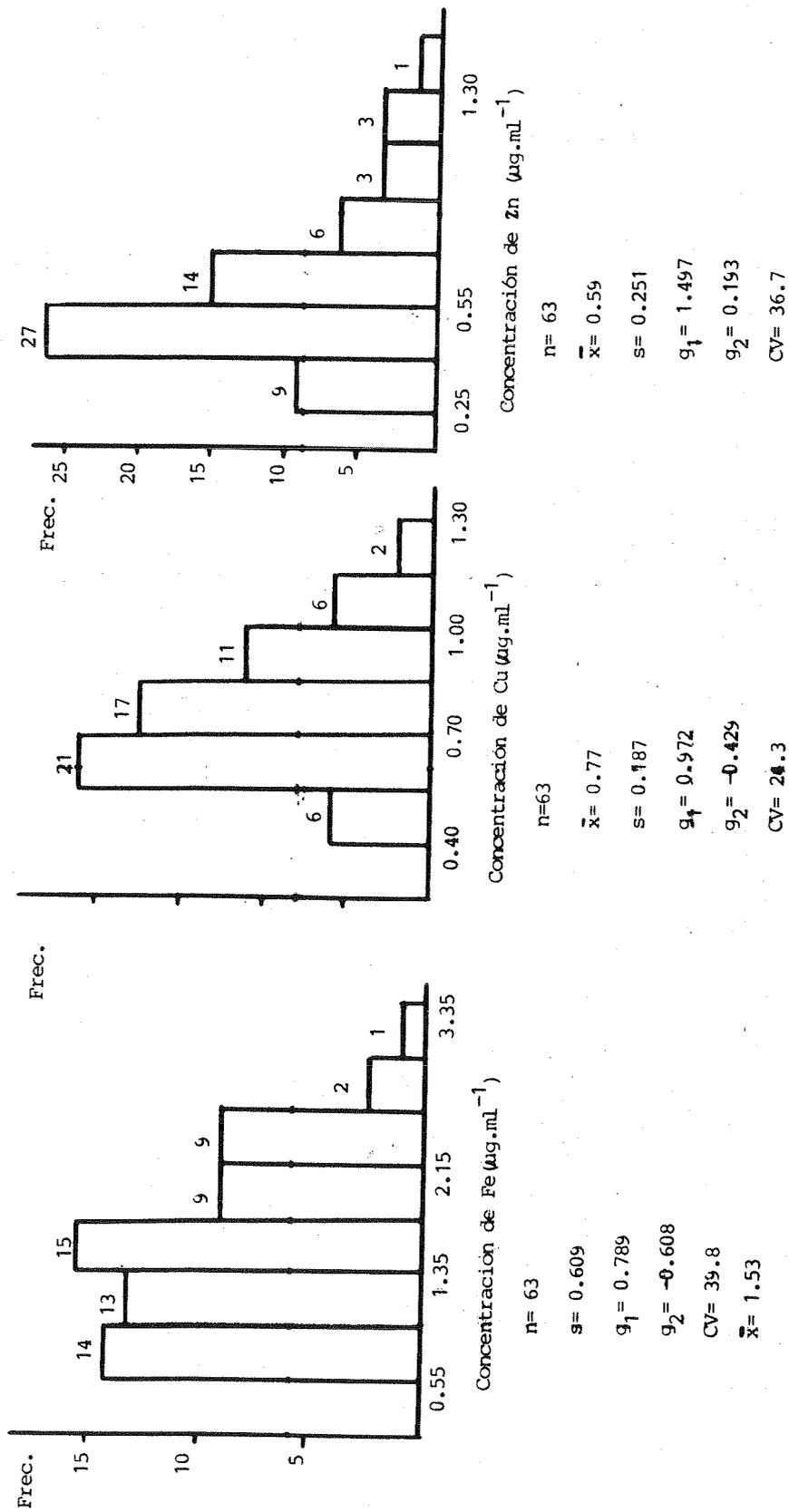
Tabla III. Valores de heterocigosis (h) en cada locus analizado y heterocigosis media ( $\hat{H}$ ). Se han estudiado dos métodos: conteo directo y mediante el valor de las frecuencias génicas (Nei y Roychoudbury, 1974).

SISTEMA	Conteo directo h	A partir de las frecuencias génicas h
Albúmina	0.489	0.489
Esterasa alcalina	0.440	0.486
Esterasa ácida	0.368	0.545
Transferrina	0.792	0.672
	H = 0.512	$\hat{H}$ = 0.551
		V(h) = 0.007
		V( $\hat{H}$ ) = 0.002

V(h) = Varianza de la heterocigosis de los diferentes loci.

V( $\hat{H}$ ) = Varianza de la heterocigosis media.

Figura 1. Histograma de frecuencias correspondiente a las concentraciones de Fe, Cu y Zn en plasma de la población de caballos estudiada. ( $g_1$  = coeficiente de asimetría;  $g_2$  = coeficiente de curtosis; CV = coeficiente de variación).



Bibliografía

1. Bengtson y col. Acta Agr. Scand. 18, 60-64 (1968).
2. Braend, M. Nord. Vet. Med. 16, 363-373 (1964).
3. Braend & Stormont. Nord. Vet. Med. 16, 31-37 (1964).
4. Efremov & Braend. Proceedings Europ. Anim. Blood Groups Conf. Prague 323-325 (1965).
5. Ghane, B. Hereditas. Lond. 50, 126-135 (1963).
6. Ghane, B. Genetics. 53, 681 (1966).
7. Hesselhot, M. Acta. Vet. Scand. 7, 206-225 (1966).
8. Kaminsky, M. Biochem. Biophys. Acta, 191, 611-620 (1969).
9. Kaminsky y col. Ann. Génét. Sél. Anim. 6, 195-210 (1974).
10. Nei & Roychondhury. Genetics. 76, 379-390 (1974).
11. Scott. Anim. Blood Groups. Biochem. Genet. 1, 253-254 (1970).
12. Scott. XIth Eur. Conf. Anim. Blood Grps. Biochem. Polymorph., The Hague, 551-553 (1972).
13. Smithies, O. Biochem. J. 61, 629-641 (1955).
14. Stormont & Susuki. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114, 673-675 (1963).
15. Underwood, E.J. The Mineral Nutrition of Livestock. Commonw. Agric. Bur., Farnham Royal, 237 pp. (1966).
16. Underwood, E.J. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Academic Press, New York, N.Y., London, 545 pp. (1977).
17. Wiener & Field. J. Agric. Sci., Camb. 76, 513-520 (1971).
18. Wiener y col. Anim. Prod. 19, 291-299 (1974).