

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“Comprobación de la Paternidad en Equinos por”
Determinación Electroforética de 6 Sistemas-
de Grupos Sanguíneos Solubles.**

T E S I S

Que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
p r e s e n t a:
JOSE RICARDO VERGARA OCHOA

A S E S O R :

M. V. Z. M. SC. JUAN GARZA RAMOS

1975.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO
DE INMUNOGENETICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, SIENDO ASESORADO
POR EL :**

M.V.Z. M.Sc. JUAN GARZA RAMOS.

EN MEMORIA DE MI MADRE

YOLANDA OCHOA DE VERGARA

Con gran afecto por su amor, cariño
que siempre me brindo.

A MI PADRE

RICARDO VERGARA ACEVES

Que por su ejemplo, cariño y confianza
me hicieron posible realizar este anhelo.

A MIS HERMANOS

YOLANDA

Por su amor y apoyo en la
culminación de este esfuerzo.

ALEJANDRO

MARIA GUADALUPE

FRANCISCO JAVIER

MARIA DEL CARMEN

Por su cariño y estímulo constantes
en mi superación.

A Ra

Con respeto y agradecimiento por
su ayuda brindada.

A MI ASESOR Y AMIGO

JUAN GARZA RAMOS

Con agradecimiento por
su inapreciable ayuda
y asesoramiento en la
elaboración y desarrollo
de este trabajo.

A MI MEJOR AMIGO

JORGE ERNESTO VOLLRATH ALMADA

A MIS TIOS

FRANCISCO FUENTES C.

LOLITA TEIXIDOR DE FUENTES

MARUCA TEIXIDOR B.

Con profundo cariño y agradecimiento
por su amor, consejos que me brindaron
para mi formación y culminación de este
trabajo.

A MIS TIOS Y PRIMOS

INDICE

INTROUCCION

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

RESUMEN Y CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

INTRODUCCION.

El estudio referente a la investigación de los grupos sanguíneos, ha dado lugar a que se reconozcan dos tipos principales:

A- Grupos sanguíneos eritrocíticos ó grupos sanguíneos celulares.

B- Grupos sanguíneos que se encuentran en el plasma e interior de glóbulos rojos ó grupos sanguíneos solubles.

En el primer grupo, los estudios se realizan por medios serológicos, para lo cual es necesaria la utilización de antisueros específicos.

Se han estudiado las características sanguíneas de los equinos, con la idea de que el conocimiento obtenido pueden ser útil no solo para resolver problemas de parentesco dudoso, sino también para disminuir la incidencia de enfermedades hemolíticas de los recién nacidos (Isoeritrolisis). En México los estudios realizados con este propósito han sido reportados por Vollrath, (1975).

Se conocen varios reactivos para tipificar los eritrocitos de la sangre de equinos que revelan una amplia variedad de diferencias antigénicas en los glóbulos rojos.- Los sistemas sanguíneos de los eritrocitos; los antígenos presentes y los antisueros empleados en la especie equina han sido descritos por Stormont y Suzuki (1965).

Por otro lado, el estudio de los grupos sanguíneos solubles se ha realizado gracias a las técnicas de electroforesis (Tiselius, 1937), que se basan en la aplicación de una corriente directa, con el objeto, de lograr la separación por migración de moléculas ionizadas que estén presentes en: a) - Un medio líquido (electroforesis libre) o en b) - Un medio semisólido (electroforesis zonal).

La electroforesis zonal tiene más ventajas en relación con la electroforesis libre, tales como: una mayor separación de las moléculas, debido a que ésta se lleva a cabo de acuerdo a su carga eléctrica, y también retiene a las moléculas grandes, haciéndolas migrar lentamente, permitiendo que las moléculas más pequeñas migren más fácilmente.

En equinos se han encontrado diferencias genéticamente controladas en los sistemas de: transferrinas, albúminas, pre-albúminas, esterases en plasma, anhidrasa carbónica y catalasas intraeritrocíticas. (Stormont y Suzuki, 1963, y 1964, Gahne, 1965, Sandberg, 1968, Stevens, 1969, Juárez, 1970, y Kelly y colaboradores, 1971).

Los estudios que se realizaron en este trabajo constan de 6 sistemas electroforéticos: transferrinas, albúminas, y esterases del plasma, y catalasas y anhidrasas carbónicas intraeritrocíticas.

Sistema de Transferrinas (Tf).-Denominadas también

siderofilinas, son protefmas del grupo de las beta-globulinas, cuya función es la de transportar el hierro en el plasma, existen en muchas formas hereditarias, en los vertebrados. Su peso molecular es de 90,000 y parecen estar compuestas de una sola cadena polipeptídica. Existen variaciones heredables en cuanto se refiere a su movilidad electroforética. Estas variaciones, al menos en el ser humano, parecen estar sujetas a cambios leves en la estructura molecular, (An Chuang Wong y Col. 1966). Su capacidad para transportar fierro fué demostrada con Fe ⁵⁹ (Smithies y Hickman, 1958).

De acuerdo a la revisión de Juárez (1970)., se han realizado estudios de transferrinas en: bovinos (Ashton, 1958) (Smithies y Hickman, 1958), porcinos Ashton, 1960), palomas (Mueller, 1961), monos (Goodman, Poulik, 1961), ratones (Ashton y Braden, 1961), borregos y cabras (Ashton, Ferguson, 1963), - antilopes (Ashton, Carr, 1965) focas (Naerdal, 1965), atunes (Kazus Fujina, Taga y Kan, 1967), burros (Niece, Kracht, 1967) y además humanos (Harris, 1961).

Braend (1964) publicó sus estudios sobre los tipos séricos de los caballos de Noruega. Reportando el polimorfismo genético de las transferrinas por 5 alelos codominantes en un locus autosomal, en un grupo de 222 caballos.

Los fenotipos encontrados en equinos son 15: DD, DF, DH, DO, DR, FF, FH, FO, FR, HH, HO, HR, OO, OR, RR. Estos fenotipos fueron clasificados según su velocidad decreciente de migración por medio de electroforesis, es decir, el fenotipo DD tiene

una mayor velocidad migratoria que el RR. Gahne (1965) demostró que utilizando técnicas especiales las transferrinas -- clasificadas como F podían ser de dos tipos: F_1 y F_2 con lo que se aumentó el número de alelos conocidos a 6 y de fenotipos a 21. Sin embargo ésta subclasificación del alelo F no resulta fácil de realizar en la práctica, por la dificultad de la técnica y por su difícil interpretación.

Sistemas de Albúminas (ALb)..- Son proteínas que se encuentran normalmente en concentraciones elevadas en el plasma, de peso molecular de 60,000, miden $150 \times 38\text{Å}$ y tienen un punto isoeléctrico a P.H. 2.7 (Pijoan, 1969).

Stormont y Suzuki (1963) estudiaron en equinos el control genético de los fenotipos de albúmina por 2 alelos, reportando 3 fenotipos: AA, AB, BB.

Gahne (1965) reportó también 3 diferentes fenotipos de albúminas: FF, FS, SS. correspondientes respectivamente a: AA, AB, BB. Los diferentes tipos de albúminas se transmiten también genéticamente por codominancia y son detectables por electroforesis de zona.

Sistema de Prealbúminas: Con buffer alcalino Gahne (1965) descubrió una fracción de proteína que migró más rápido que las albúminas.

En algunos geles varias fracciones fueron demostradas en el área frente a las albúminas que fueron denominadas --

pre-albúminas y designadas PR. mostraron una variante regular entre las muestras de plasma, se observaron hasta ocho diferentes fenotipos de pre-albúminas. Las designaciones F, I.L, S, se usaron para las zonas principales.

El fenotipo LL fué el más común. Los fenotipos, II, y SS tenían el mismo patrón de proteínas que el tipo LL - exceptuando que las zonas tenían otras velocidades de migración. Este sistema tiene el inconveniente, de acuerdo con -- los reportes de la literatura, de que no es fácilmente reproducible y sólo en algunos geles puede interpretarse adecuadamente.

Sistema de Esterasas (Es).- Son enzimas poco -- específicas, que atacan diversas uniones éster sin tomar en cuenta el tipo de estructura química, situada a cada lado - de la unión.

Empleando electroforesis en geles de almidón y técnicas de tinción histoquímica se han reportado en el plasma de los caballos formas múltiples de esterazas.

Kaminski y Gajos (1964) describieron 2 fracciones de esterazas manchadas intensamente y 2 zonas de actividad leve pero no observaron en 51 caballos diferencias individuales. Oki, Oliver y Funnel (1964) descubrieron 11 zonas de esteraza en zimogramas de 94 caballos y reportaron una forma de colinesterasa variable que parecía genéticamente controlada.

Gahne (1965) reportó 6 fenotipos diferentes de esterasas plasmáticas. A los alelos responsables de estos fenotipos los designó como F, I, S y O. Los 3 primeros dan lugar a bandas de actividad de esterases, en tanto que el alelo o se caracterizaba por no tener actividad de esterasa en el plasma. A diferencia de los sistemas de transferrinas, albúminas y prealbúminas descritas anteriormente, en que los alelos responsables son codominantes (en los individuos heterocigóticos se observan las proteínas de ambos tipos) en el sistema de esterases el alelo O es recesivo y los alelos F, I y S son -- codominantes entre sí.

Sistema de Catalasas (Cat).- Esta enzima cataliza a la reacción siguiente:



Conocida por la sorprendente velocidad con la que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua, una molécula de catalasa puede destruir 44,000 moléculas de peróxido de hidrógeno por segundo. Está catalogada como una de las enzimas conocidas, más efectivas.

Thrup y Cois (1961) desarrollaron una técnica de -- tinción para localizar a la enzima en un gel de almidón después de la electroforesis.

Con esa técnica Kelly y Cois (1971) realizaron un -- estudio genético del polimorfismo de la catalasa de glóbulos --

rojos de equinos. Estos autores encontraron 3 fenotipos de, signados F, M. y S. Propusieron que los fenotipos estaban controlados por 2 alelos F y S y que el fenotipo M representaba a los individuos heterocigóticos.

Sistema de anhidrasas Carbónicas de los Eritrocitos Equinos (AC).

El polimorfismo electroforético de la anhidrasa carbónica (AC) ha sido reportado en humanos (Shaw, 1962), en el ganado doméstico y bisonte americano (Sertore y cols. 1969) y en ovinos (Tucker y cols. 1967).

En cada especie las variantes de AC parecieron estar controladas por alelos autosomales codominantes.

Sandberg (1968) describió un polimorfismo genético de anhidrasa carbónica de los eritrocitos equinos. Descubrió cinco zonas de anhidrasa carbónica designados F, I, L, O y S con diferente movilidad electroforética.

Cada individuo tenía una ó dos zonas de anhidrasa carbónica.

Los datos genéticos de familias estudiadas fueron consistentes con la interpretación de que los fenotipos de AC son controladas por cinco alelos autosomales codominantes, designados F, I, L, O, y S. Una variación cuantitativa considerable en la intensidad de oxidación de la enzima entre individuos fué observada.

Los propósitos de utilizar los grupos sanguíneos solubles de los equinos están basados en:

- 1.- Comprobación, determinación ó exclusión de la paternidad
- 2.- Identificación de los individuos.
- 3.- Comparación de las frecuencias obtenidas en diferentes razas.
- 4.- Conocer en el futuro por medio de estas pruebas si hay relación entre un grupo sanguíneo soluble y alguna especialidad zootécnica.

En los países en donde el valor de los animales ha alcanzado cifras muy elevadas, el estudio de los grupos sanguíneos para verificar, determinar ó excluir la paternidad se ha usado para la protección del comprador y también como garantía que otorga el vendedor.

Cuando yeguas registradas son cubiertas por 2 garrañones registrados, el producto resultante puede registrarse -- como descendencia de ambos garrañones, que ocasiona problemas - en los pedigrís que se archivan, pero despues de una prueba de determinación de paternidad por grupos sanguíneos es posible - realizar el registro con el semental correspondiente, lo que ocasiona un incremento de su valor zootécnico y económico.

En México, Juárez (1970) realizó estudios preliminares para señalar la posibilidad de comprobar la paternidad por medio de la determinación de grupos sanguíneos solubles - en equinos.

El objetivo de este trabajo es comprobar un árbol

genealógico por medio de electroforesis zonal comparativa de sueros de familias de equinos de un mismo criadero, -- tratando de evitar con esto posibles fraudes, engaños ó directamente el daño a la pureza de una ó varias razas.

La aplicación práctica de este trabajo está dada en base a una hipótesis a probar que es el árbol - genealógico (pedigri) de los individuos a estudiar.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico.- Se emplearon 48 muestras sanguíneas (sueros y glóbulos rojos lavados) de 45 animales cuarto de milla, y 3 de pura sangre Inglés, todos de un mismo criadero. Los datos sobre la relación familiar entre los animales se obtuvieron de los registros de la explotación y de los libros de registro de la Asociación Mexicana de Criadores de Caballos Cuarto de Milla.

1.- El suero de los equinos se obtuvo por sangrado de la vena yugular y se recolectó en tubos vacutainer (Becton and Dickinson) estériles y al vacío, las muestras se mantuvieron en refrigeración y al llegar al laboratorio se centrifugaron a 1,250 r. p. m. X 10 minutos. El suero decantado se conservó en congelación hasta el momento de su empleo.

2.- Los glóbulos rojos fueron obtenidos de la vena yugular y recolectados en tubos vacutainer con E.D.T.A. estériles y al vacío. Se centrifugaron las muestras a 1,250 r.p.m. x 10 minutos, lavándose con solución salina al .9% 3 veces y posteriormente se conservaron los paquetes de glóbulos rojos

en congelación hasta el momento de su empleo.

La identificación de los grupos sanguíneos solubles se realizó por medio de electroforesis en gel de almidón empleando una técnica para cada uno de los sistemas estudiados: prealbúminas, albúminas, transferrinas y esterases séricas y anhidrasas carbónicas y catalasas intraeritrocíticas.

Cada gel se preparó de acuerdo con las técnicas de Kristjanson (1963) modificadas, mezclando una cantidad determinada de almidón hidrolizado de papa con una solución buffer. Esta última solución se agregó primero una parte en frío agitando el matraz donde se encontraba contenida la cantidad de almidón hasta formar una suspensión, posteriormente se agregó la otra parte de solución buffer en ebullición para lograr la gelificación del medio.

Se procedió a retirar inmediatamente el aire que se encontraba dentro del medio usando una bomba de vacío - - vertiendo el gel en un molde de vidrio de 14 X 21 X .06 cm.

Se cubrió con un vidrio al que se le puso previamente una delgada capa de glicerina. Una vez enfriado el gel (18 hrs. a temp. ambiente), este segundo vidrio se substituyó por un papel celofán.

El gel se incidió a 4 cm del extremo denominándose a esta incisión como origen, en donde se insertaron cuadros

(6x6 mm) de papel filtro embebidos en los sueros ó en los glóbulos rojos de las muestras.

La cantidad de muestras que pudo albergar cada -- gel dependió del sistema que se estudió y varió de 9 a 18. Después de colocadas las muestras se levantaron 2 cm de papel celofán de cada extremo, y se colocó el molde sobre unos soportes de madera y se conectó el gel con 2 recipientes (+ y -) que contenían la solución buffer de los electrodos a través de una tira de papel para cromatografía embebido en el buffer.

Se aplicó una corriente variable según la técnica utilizada, y se procedió a retirar las muestras en el tiempo que indicaba la técnica. Al término de la electroforesis, -- los gels fueron dejados enfriar y posteriormente cortados -- longitudinalmente en dos mitades de 3 mm de espesor, y posteriormente teñidos con diferentes técnicas específicas para -- cada sistema, que posteriormente se describen.

Sistema de Transferrinas.

Se utilizaron 38gr de almidón hidrolizado de papa en 250 ml de una solución buffer compuesta de 30 gr tris y 3gr de ácido cítrico por litro de H₂O destilada con un pH de 8.6. (70ml de buffer en frío, 180ml de buffer en ebullición).

El buffer de los electrodos fué de .3M de ácido bórico y .1M de hidróxido de sodio (NaOH) con un pH de 8.6. (Juárez, 1970). Se aplicó una corriente inicial de 75ma (320V) durante 15 minutos y se retiraron las muestras. Se mantuvo la -- corriente inicial (75ma) hasta que la banda de migración de --

boratos llegó a 12 cm. El tiempo variable fué de 1 hora con 50 minutos.

Se retiró el gel y se cortó longitudinalmente en 2 mitades de 3 mm cada una. Ambos se tñieron con amido negro al 0.5% durante 30 seg., se lavaron con agua corriente y posteriormente se sumergieron en solución lavadora (5 partes de agua, 5 partes de metanol y una parte de ácido acético) durante 48 horas. Posteriormente se envolvieron en papel celofán y se conservaron en refrigeración hasta su interpretación.

Sistemas de Albúminas y Pre Albúminas

El gel se preparó con 38 gr de almidón en 250ml de solución buffer (14 ml de solución A + 9 ml de solución B aforado a 250ml con agua destilada) a un pH de 6.4.

solución A = .05M de ácido cítrico.

solución B = .19M de tris.

(70ml de solución buffer en frío y 180ml de buffer en ebullición) el buffer de los electrodos fué el mismo que se empleó para el sistema de transferrinas. (Juárez, 1970).

Se aplicó una corriente inicial de 25ma (265V) durante 10 minutos y se retiraron las muestras, se aumentó la corriente a 30ma hasta que la banda de migración de boratos alcanzara 13 cm del extremo catódico.

El tiempo variable fué de 2 horas con 45 minutos.

Tinción.- Se tñieron con el mismo proceso empleando para los geles del sistema de transferrinas.

Sistema de Esterasas.

El gel (semejante al empleado para determinar las transferrinas) se preparó con 38 gr de almidón en 250ml de solución buffer (30gr tris, 3gr ácido cítrico) X lts de H₂O destilada) a un pH de 8.5 (70ml en frío + 180ml en ebullición.)

Buffer de los electrodos (.3M de ácido bórico y .1M de NaOH) a un pH de 8.6.

Se aplicó una corriente inicial de 50ma (170V) durante 15 minutos, se retiraron las muestras y se aumentó la corriente a 75ma (250V) hasta que la banda de migración de boratos alcanzara 8cm de la línea de inserción. (Júarez, 1970). El tiempo promedio fué de 2 horas con 20 minutos.

Tinción.- Se puso el gel en un recipiente de vidrio y se le añadieron las siguientes soluciones. Buffer a un pH de 6.5, 50ml. (14ml de solución A + 9ml de solución B+25ml de H₂O destilada), metanol 50ml. 30 segundos despues se le agregaron 2ml de alfa-naftil acetato al 1% y 50mg de solución de azul rápido 50mg. (Mar, 1969). En un tiempo - promedio de 10 minutos se observaron las esterazas, se hizo el diagrama de las mismas y se cambió a solución lavadora y a las 48 horas se envolvieron los geles en papel celofán y se guardaron en refrigeración.

Sistema de Catalasas.

Los geles se hicieron con 38gr de almidón y 250ml de buffer con tris (20.2gr) y E.D.T.A. (2gr) y ácido bórico (15 gr) por litro con un pH de 8.7.

El buffer de los electrodos fué de .3M de H_3BO_3 .1M de NaOH con pH de 8.9.

se aplicó una corriente inicial de 30ma (165V) durante 2.5 minutos, se hizo la remoción de las muestras (los papeles fueron embebidos en H_2O destilada, anteriormente a las muestras de glóbulos rojos) y se aumentó la corriente a 40ma (300V) hasta que la banda de boratos migrara 12 cm del origen, (Martínez, 1975). El tiempo promedio fué de 4 -- horas.

Tinción.- Se puso el gel en un recipiente de plástico y se le agregó: 50ml de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ (0.06M) más una -- gota en cada muestra del gel de H_2O_2 (Peróxido de Hidrógeno), se dejó en reposo hasta que desaparecieron unas burbujas en el sitio de las catalasas (2 minutos), e inmediatamente se cambió de solución, por 250ml de H_2O + 15gr de KI + 1ml de H_2O_2 y el almidón se tiñó de negro y el sitio de actividad de las catalasas permaneció en blanco. Este sistema fué modificado de Thrup y cols. (1961).

Sistema de Anhidrasa Carbónica.

Los geles se hicieron el igual que los de las

catalasas, con 38gr de almidón y 250ml de buffer con tris. (20.2gr) E.D.T.A. (2gr) y ácido bórico (1.5gr) por litro y con un pH de 8.7.

El buffer de los electrodos fué de .3M H_3BO_3 y .1M NaOH con un pH de 8.9. Se aplicó una corriente inicial de 30ma (165V) durante 30 minutos, se hizo la remoción de las muestras y se aumentó la corriente a 40ma (300V) hasta que la banda de boratos migrara 12 cm de origen. El tiempo promedio fué de 4 horas.

Tinción.- Con amido negro durante 5 minutos, se dejaron 24 horas en solución lavadora y después se realizó la lectura.

Los cálculos de las Frecuencias de Fenotipos y alelos se hicieron de acuerdo con la ley de Hardy Weinburg como señalan Falconer (1960) y Srb y Cois. (1965).

RESULTADOS

RESULTADOS.

Sistema de transferrinas .- En los geles se observaron 5 fenotipos designados DD, DF, DO, FF y FO. No fué posible diferenciar la subclasificación del alelo F, reportada por Gahne (1965), ya que como quedó aclarado en la introducción de este trabajo, la diferenciación de los fenotipos F, es difícil de lograr en trabajo de rutina. Por lo anterior se siguieron los lineamientos de Braend (1964), designando a los individuos como F.

El cuadro 1 muestra el número de animales observados con cada fenotipo, las frecuencias determinadas para los diferentes fenotipos, y las frecuencias calculadas para cada uno de los alelos de este sistema, en el total de animales estudiados (48) y en los de raza Cuarto de Milla (45).

La figura 1 muestra la fotografía de un gel preparado para estudiar el sistema de transferrinas, en el que están representados algunos de los fenotipos observados.

El cuadro 6 muestra los fenotipos de cada uno de los integrantes de las familias estudiadas, para probar la paternidad de las crías.

Sistema de albúminas .- Los fenotipos observados en este sistema fueron los designados FF, FS, SS. El

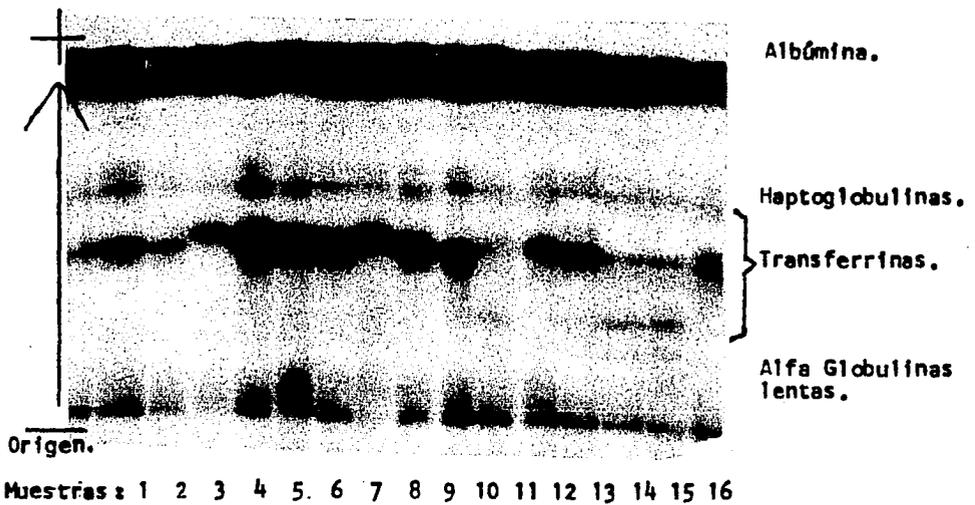
CUADRO 1

FRECUENCIAS DE FENOTIPOS Y ALELOS DE TRANSFERRINAS.

Núm. total de animales.	Fenotipos observados.					Frecuencia de fenotipos observados.					Frecuencia de alelos.				
	DD	DF	DO	FF	FO	DD	DF	DO	FF	FO	D	F	H	O	R
48	2	19	5	13	9	.042	.396	.104	.271	.187	.30	.55	_	.15	_
CUARTO DE MILLA 45	2	17	5	12	9	.044	.378	.111	.267	.200	.28	.57	_	.15	_

FIGURA 1

FENOTIPOS DE TRANSFERRINAS OBSERVADAS DESPUES
DE ELECTROFORESIS ZONAL DE SUERO EQUINO.



FENOTIPOS:

DD: 4, 8

FF: 1, 2, 3, 10, 12, 13

DF: 5, 6, 7, 9, 16

DO: 11

FO: 14, 15

cuadro 2 contiene los datos correspondientes al número de animales observados con cada fenotipo, y las frecuencias determinadas en los alelos de este sistema. Se calcularon las cifras anteriores para el total de muestras y para los correspondientes a animales de la raza Cuarto de Milla.

La figura 2 muestra la fotografía de un gel en donde se observan las características de los diferentes fenotipos de este sistema. Los datos de los fenotipos de albúminas de los padres y las crías en las familias estudiadas, se encuentran en el cuadro 6.

Sistema de Pre-albúminas .- Solamente se observaron 2 fenotipos en los animales analizados: LL e IL. Pero desafortunadamente en este trabajo se corroboró lo expresado en la literatura, en el sentido de que solamente en algunos geles se pudieron determinar los fenotipos de este sistema.

El cuadro 3 indica el número de equinos observados para cada fenotipo, así como las frecuencias calculadas para los fenotipos y para los alelos de este sistema. De las 48 muestras estudiadas, solamente se lograron determinar las prealbúminas en 24 casos. Las frecuencias se calcularon también para todos los animales y para los 22 de raza Cuarto de Milla.

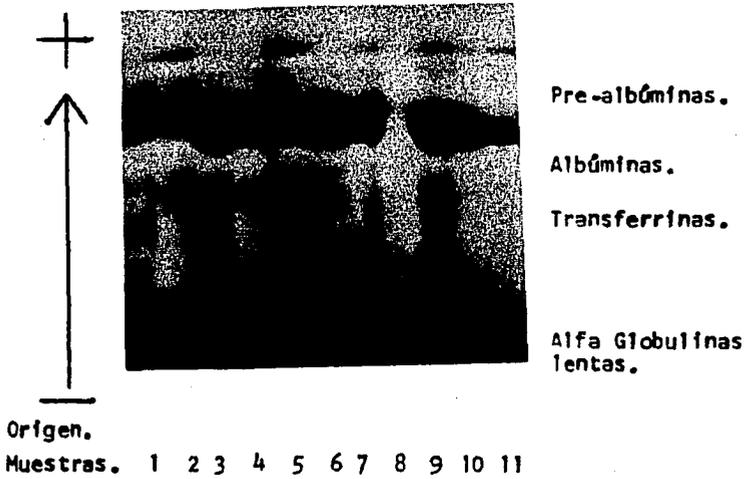
La fotografía de un gel en el que se pueden -

CUADRO 2

FRECUENCIAS DE FENOTIPOS Y ALELOS DE ALBUMINAS.

Núm. total de animales.	Fenotipos observados.			Frecuencia de fenotipos observados.			Frecuencia de alelos.	
	FF	FS	SS	FF	FS	SS	F	S
.48	8	28	12	.167	.583	.250	.46	.54
CUARTO DE MILLA 45	8	26	11	.178	.578	.244	.46	.54

FIGURA 2

FENOTIPOS DE PRE-ALBUMINAS Y ALBUMINAS.

FENOTIPOS:

Pre-albuminas.

LL: 2, 5, 7, 8, 10, 11

RL: 1, 3, 4, 6, 9

Albúminas.

FF: 1, 2

FS: 3, 4, 5, 6, 7, 8

SS: 9, 10, 11

.CUADRO 3

FRECUENCIA DE FENOTIPOS Y ALELOS DE PRE-ALBUMINAS.

Núm. total de animales.	Fenotipos observados.		Frecuencia de fenotipos observados.			Frecuencia de alelos.		
	LL	IL	LL	IL	F	I	L	S
.24	12	12	.500	.500	.0	.25	.75	.0
CUARTO DE MILLA 22	12	10	.546	.454	.0	.23	.77	.0

observar los fenotipos del sistema de pre-albúminas, está representada por la figura 2.

Las familias estudiadas en el sistema de pre-albúminas pueden consultarse en el cuadro 6, que contiene los fenotipos determinados en cada individuo.

Sistema de esterases .- Se observaron individuos que fueron clasificados en 4 fenotipos : II, FI, FS e IS.

En vista de que en este sistema existe el alelo 0, que se manifiesta por la ausencia de la actividad de esterasa en el plasma, no pudo determinarse si los individuos designados II eran efectivamente homocigóticos para el alelo I o si eran heterocigóticos y estaban por lo tanto - erróneamente clasificados.

Por esta razón no se calcularon para este sistema las frecuencias de los fenotipos observados ni de los alelos.

El cuadro 4 contiene los datos del número de los animales con fenotipos FI, FS ó IS, y el número de animales en los que no se pudo determinar si eran II ó IO para el total de animales y para los de raza Cuarto de Milla.

CUADRO 4

NUMERO DE ANIMALES Y FENOTIPOS OBSERVADOS EN EL SISTEMA DE ESTERASAS SERICAS.

Nú. total de animales.	Fenotipos observados.					
	II	6	IO	FI	FS	IS
48	40		3	3	2	
CUARTO DE MILLA 45	38		2	3	2	

La figura 3 muestra un esquema de los fenotipos de esterasas séricas observados.

Sistema de catalasas .- Para este sistema solamente se observaron los fenotipos M y S en las muestras de los individuos analizados.

La técnica para teñir los geles y determinar la velocidad de migración electroforética de estas enzimas, dió aparentemente mejores resultados que los obtenidos por Kelly y cols. (1971), quienes reportaron tener dificultades en la ejecución de la técnica. Las modificaciones al método de tinción adoptadas en este trabajo permitieron que sin dificultad se pudiera llevar a cabo la interpretación de los fenotipos de este sistema.

La figura 4 muestra la fotografía de un gel con los fenotipos de catalasas observados en el contenido de los eritrocitos lisados.

Los datos correspondientes al número de equinos encontrados con cada fenotipo y los datos de los cálculos realizados para determinar las frecuencias de fenotipos y alelos para éste sistema de catalasas se encuentran en el cuadro 5. Por separado se expresan los resultados en los cálculos hechos con todas las muestras y con las de individuos de la raza Cuarto de Milla.

.FIGURA 3

ESQUEMA DE LOS FENOTIPOS OBSERVADOS EN EL
SISTEMA DE ESTERASAS SERICAS.

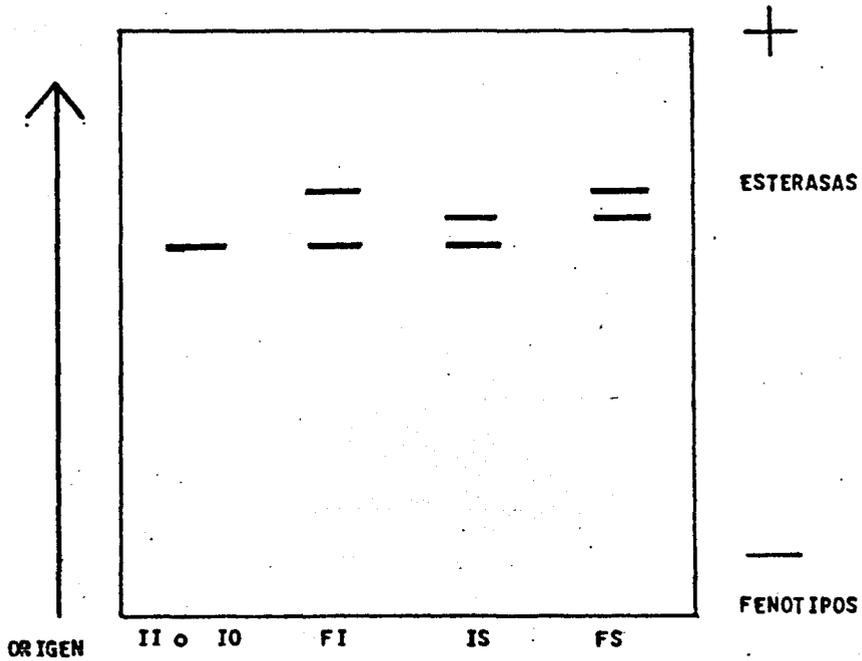
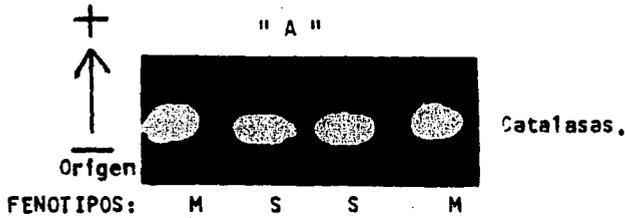


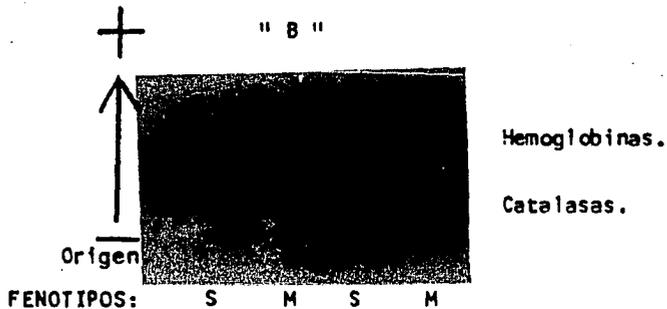
FIGURA 4

FOTOGRAFIAS DE GELES PARA EL SISTEMA DE CATALASAS.

LA FOTOGRAFIA "A" MUESTRA LOS FENOTIPOS OBSERVADOS DESPUES DE LA TINCION.



LA FOTOGRAFIA "B" MUESTRA LAS ZONAS DE ACTIVIDAD DE CATALASA (burbujas) AL AGREGAR AL MEDIO PEROXIDO DE HIDROGENO.



CUADRO 5

FRECUENCIA DE FENOTIPOS Y ALELOS EN EL SISTEMA
DE CATALASAS INTRAERITROCITICAS.

Núm. total de animales.	Fenotipos observados.			Frecuencia de fenotipos observados.			Frecuencia de alelos.	
	F	M	S	F	M	S	F	S
48	-	27	21	-	.563	.437	.28	.72
CUARTO DE MILLA 45	-	25	20	-	.556	.444	.28	.72

CUADRO 6

FENOTIPOS OBSERVADOS EN LOS SISTEMAS ESTUDIADOS
EN LOS ANIMALES INTEGRANTES DE LAS FAMILIAS.

	♂	P. Alb.	Alb.	Tf.	Es.	Cat.	1	♀	P. Alb.	Alb.	Tf.	Es.	Cat.	Crias.	P. Alb.	Alb.	Tf.	Es.	Cat.
A	-	FS	DF	II	S	1	-	-	FS	FF	II	M	I	-	SS	DF	II	S	
A	-	FS	DF	II	S	*2	-	-	FS	DF	II	M	II	-	FF	DF	II	S	
A	-	FS	DF	II	S	3	-	-	FS	FO	II	S	III	-	FS	FO	II	S	
B	LL	FS	DD	II	M	4	IL	FS	DF	II	M	IV	LL	FF	DF	II	M		
B	LL	FS	DD	II	M	5	IL	FS	DF	II	S	V	LL	FS	DF	II	M		
*C	IL	SS	FF	FI	M	6	LL	SS	FO	II	M	VI	LL	SS	FF	II	M		
D	IL	FS	FF	II	S	7	IL	FS	DF	II	M	VII	LL	FS	FF	II	M		
D	IL	FS	FF	II	S	8	IL	FF	DF	II	M	VIII	LL	FF	FF	II	M		
D	IL	FS	FF	II	S	9	IL	FS	FO	II	S	IX	LL	FF	FF	II	S		

* .. ANIMALES PURA SANGRE INGLES.

Sistema de Anhidrasas Carbónicas .-Cada una de las determinaciones del polimorfismo de un sistema, requiere de una técnica especial. El desarrollo de estas técnicas de electroforesis, se logra haciendo algunas de las muchas modificaciones posibles. La técnica empleada en este trabajo para identificar diferencias en la velocidad electroforética de las anhidrasas carbónicas de los equinos, fué la misma que se ha empleado con éxito para otras especies, como bovinos (Sartore y cols, 1968) y ovinos (Guzmán y cols, -- 1975). A pesar de lo anterior dicha técnica no fué lo suficientemente precisa como para permitir la interpretación adecuada de los fenotipos de AC de los eritrocitos equinos descritos por Sandberg (1968).

El cuadro 7 muestra los fenotipos observados en cada uno de los sistemas estudiados en los animales no integrantes de las familias.

CUADRO 7
 FENOTIPOS OBSERVADOS EN LOS SISTEMAS ESTUDIADOS
 EN LOS ANIMALES NO INTEGRANTES DE LAS FAMILIAS,

♀	P. Alb.	Alb.	Tf.	Es.	Cat.	♀	P. Alb.	Alb.	Tf.	Es.	Cat.
10	IL	SS	DF	II	M	23	—	FS	DF	FS	M
11	—	SS	FF	II	S	24	—	SS	FF	II	S
12	—	FF	FO	FS	S	*25	IL	FS	DF	II	S
13	—	FS	DO	II	M	26	—	FS	FO	FI	M
14	IL	FF	DF	II	S	27	—	FS	FF	II	M
15	—	FS	DO	II	S	28	—	FS	DO	II	M
16	—	FS	FF	II	S	29	—	FS	DF	II	M
17	—	SS	FO	II	S	30	—	FS	FF	IS	M
18	—	FS	FF	II	M	31	—	SS	DO	II	S
19	LL	FS	FO	IS	S	32	LL	SS	DF	II	M
20	—	FS	DO	FS	M	33	—	FS	DF	II	M
21	IL	FF	DF	II	M	♀ E	LL	SS	DD	II	S
22	LL	FS	FO	FI	M	♀ F	IL	SS	DF	II	S

* .. ANIMAL PURA SANGRE INGLES.

DISCUSSION

DISCUSION.

Los resultados descritos en el cuadro 6, no excluyen la paternidad en ninguno de los casos familiares, después del análisis realizado en los sistemas de Pr, Alb, Tf, Es y Cat, por lo anterior los resultados de éste estudio han podido comprobar la autenticidad de la paternidad acreditada en cada caso.

Haciendo estudios de genética de poblaciones, - en los que se determinen las características sanguíneas heredables, pueden conocerse mejor las relaciones entre diferentes poblaciones de caballos de una misma raza ó de diferentes estirpes.

El cuadro 8 se ha elaborado con la información reportada por diferentes autores sobre las frecuencias obtenidas para los alelos de Tf, Alb, Pr y Cat, en las diferentes razas en que se han publicado las cifras calculadas.

Se pueden observar las relaciones entre las diferentes razas equinas estudiadas. Resalta, la posibilidad de establecer comparaciones entre las características genéticas sanguíneas de las razas pura sangre Inglés de Sudafrica, México y E.U.A., para los sistemas de Tf y Alb. Si bien se observan algunas variaciones para las frecuencias de alelos en ciertos casos, hay muchos puntos en común que denotan una

CUADRO 8

FRECUENCIAS DE TRANSFERRINAS, ALBUMINAS, PRE-ALBUMINAS Y CATALASAS EN LAS RAZAS EQUINAS REPORTADAS Y SU COMPARACION CON LOS RESULTADOS DE ESTE ESTUDIO.

RAZAS, LUGAR DE ESTUDIO, NUMERO DE ANIMALES ESTUDIADOS Y REFERENCIA.

Sistemas y alíeas		Pura Sangre Inglés Sud Africa (54) A	Pura Sangre Inglés México (30) B	Pura Sangre Inglés E.U.A. (150) A	Cuarto de Milla México (45) F	Cuarto de Milla E.U.A. C	Arabe Sud Africa (45) A	Shetland Ponies E.U.A. (273) A	Lipizzanos Austria (456) D	Tarpan Polonia (114) E	Salemite Italia (235) A	DBle Noruega (220) A	Fjord Noruega (104) A	Estadunidense (925) A	Basutos Sud Africa (104) A	"Caballos comunes" Sud Africa (235) A
TF	D	.167	.143	.267	.300		.300	.172	.130	.210	.410	.002	.149	.200	.062	.314
	F	.648	.714	.563	.550		.477	.446	.330	.022	.330	.234	.620	.270	.484	.478
	H	.009	.000	.027	.000		.056	.026	.120	.041	.030	.075	.000	.070	.221	.048
	M	.000	.000	.000	.000		.000	.031	.000	.000	.000	.000	.000	.010	.000	.000
	O	.046	.143	.090	.150		.165	.108	.350	.055	.170	.021	.039	.250	.046	.091
R		.130	.000	.053	.000		.000	.203	.060	.057	.010	.668	.192	.200	.186	.028
	S	.278	.286	.214	.460		.620	.397			.340	.580	.350		.529	.470
*Ib.	F	.722	.714	.786	.540		.380	.613			.660	.420	.650		.471	.621
	S															
F. Sib.	F				.00						.11					
	L				.23						.19					
	S				.77						.66					
Cat.	F			.00	.28											
	S			1.00	.72											

A.- Osterhoff, y cols. 1968.

O.- Schleger, y Soos, 1968.

B.- Juárez, 1970.

E.- Tomaszewska, y cols, 1968.

C.- Kelly, y cols. 1971.

F.- Este trabajo:

notable similitud de las características heredables de las 3 poblaciones, a pesar de su diferente localización geográfica.

Por lo que corresponde a las otras razas, en vista de que se sabe muy poco de las relaciones ancestrales que existen entre ellos, resultaría arriesgado emitir opiniones.

Por desgracia estos trabajos de determinación de las frecuencias de los grupos sanguíneos solubles en las poblaciones animales se llevan a cabo en menor proporción a la deseable, ya que por ejemplo para los caballos Cuarto de Milla que fueron objeto de este estudio, solamente se encontró en la literatura un reporte sobre las frecuencias de catalasas en esta raza, que permitieron determinar una semejanza en las características genéticas de este sistema entre las poblaciones estudiadas en California, E.U.A. y en México.

Los estudios que se han realizado en alrededor de una docena de razas equinas, han permitido que se establezcan las cifras descritas en el cuadro 8, que pudieran -- considerarse como patrón.

Lo anterior indica que el estudio de los grupos sanguíneos de los caballos no solamente puede tener aplicaciones en la comprobación, exclusión ó determinación de la paternidad, si no que también en la comparación de las características genéticas sanguíneas de los animales de una cuadra con las del patrón establecido para la raza.

El grado de semejanza que pudiera encontrarse entre las frecuencias de los diferentes grupos sanguíneos solubles daría un indicio para evaluar la pureza racial de la cuadra. Además, la falta de diversidad en las características genéticas sanguíneas puede emplearse para determinar el grado de consanguinidad.

Braend (1964), Osterhoff y cols (1968), y -- Stormont (1972), han calculado la posibilidad de excluir la paternidad de un garañón en casos en que haya 2 sementales sospechosos. Utilizando únicamente el sistema de Tf, encontraron que era posible resolver aproximadamente el 37% de los casos. Las cifras correspondientes al sistema de Alb. eran del 18%. Sin embargo utilizando conjuntamente todos los sistemas descritos para la especie equina hasta la fecha, Stormont (1972), ha reportado que las pruebas de determinación de la paternidad pueden resolver según sus cálculos el 89% de los casos en que surjan dudas. Si se considera, que además existe la posibilidad de que en el futuro cercano se descubran más sistemas de polimorfismo genético que puedan determinarse mediante la electroforesis, puede predecirse que aumentará aún más la confiabilidad de resolver los problemas de paternidad en equinos mediante el estudio de los grupos sanguíneos solubles.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Se llevó a cabo una revisión de la literatura, en lo referente a los trabajos publicados en grupos sanguíneos de equinos. Para comprobar un árbol genealógico de las familias de equinos de un criadero mediante la determinación de sus grupos sanguíneos, se obtuvieron muestras de sangre de 45 animales de la raza Cuarto de Milla y 3 de la raza pura sangre Inglés.

La identificación de los grupos sanguíneos solubles se realizó por medio de electroforesis en gel de almidón. Los sistemas estudiados fueron: Pre-albúminas, Albúminas, Transferrinas, Esterasas séricas, Anhidrasas carbónicas y Catalasas intraeritrocíticas.

Las frecuencias determinadas para los diferentes fenotipos y alelos de cada sistema en el total de animales estudiados y en los de raza Cuarto de Milla se describe en diferentes cuadros, con la excepción de los sistemas de Esterasas y Anhidrasas carbónicas, en los que no se pudieron identificar todos los fenotipos observados.

Los resultados de este estudio han podido comprobar la autenticidad de la paternidad acreditada en cada uno de los casos familiares.

Las relaciones genéticas entre las diferentes

razas de caballos o en poblaciones de la misma raza con diferente localización geográfica, se estudiaron con la información bibliográfica sobre las frecuencias de los alelos de Transferrinas, Albúminas, Pre-albúminas y catalasas. Por ejemplo las características genéticas sanguíneas de las razas pura sangre Inglés entre animales de Sud Africa, México y E.U.A., indican una notable similitud de las 3 poblaciones en los sistemas de Transferrinas y Albúminas a pesar de su diferente localización geográfica.

Para los caballos Cuarto de Milla que fueron objeto de este trabajo, solo se encontró en la literatura un reporte sobre las frecuencias de las catalasas de esta raza, que permitió determinar la semejanza en las características genéticas de este sistema entre los equinos estudiados en California, E.U.A. y México.

Se discuten también las aplicaciones del estudio de los grupos sanguíneos de los caballos, no solo en la comprobación, exclusión o determinación de la paternidad, sino también para evaluar la pureza racial de una cuadra, y el grado de consanguinidad.

Por último se señala que la determinación de los grupos sanguíneos de los equinos puede resolver el 89% de los casos en que surjan dudas de la paternidad y que en el futuro, cuando se descubran más sistemas de polimorfismo genético -- sanguíneo habrá de aumentar aún más la cifra citada.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.

- An Chuan Wong., Eldon y Howard P.N. Human Transferrin G. and Dochi An Aminoacid Difference Biochemical Genetics. - 1 : 55-59. 1966.
- Ashton, G.C., and Ferguson, A.K. Serum Transferrins in - Merino sheep. Genetics. 4 : 240-247. 1963.
- Ashton, G.C. A genetics mechanism for tread-protein and Beta-globulin Polymorphism in the serum proteins of pigs. Nature 186 : 65-66. 1958.
- Braend M. Serum Types of Norwegian Horses. Nord. Vet. Med. 15 : 363-373. 1964.
- Burstone M.S. Enzyme Histochemistry and Its Application in the study of Neoplasms. Academic Press. N. York. 1962.
- Falconer, D.S. Introduction to Quantitative Genetics. - Ronald Press. N. York. 1960.
- Gahne B. Studies on the Inheritance of Electrophoretic - forms of Transferrins, Albumins, Prealbumins and Plasma Esterases of Horses. Genetics 53 : 681-694. 1965.
- Guzmán, R, Garza, J. y Berruecos J.M. Determinación de - los Grupos Sanguíneos Solubles del Borrego Tabasco o Pe- ligüey Resúmenes de la XII Reunión Anual del I.N.I.P., S.A.G., México, p. 10, 1975.
- Juárez Becerra J.C. Polimorfismo Genético de Proteínas - Séricas de Equinos y su Utilización en la Comprobación - de la Paternidad. F.M.V.A., U.N.A.M., tesis, 1970.
- Kaminski, M. y Gajos E. Comparative examination of Car- boxylic Esterases in sera of Horses, Donkey and their - Hybrids. Nature 201 : 716-718. 1964.
- Kelly E., Stormont C. y Suzuki. Catalase Polymorphism in the Red Cell of Horses. Animal Blood Groups and Bioche- mical Genetics 2 : 135-143. 1971.

- Kristjansson F.K., Genetic Control of Two Pre-Albumins - in pigs. *Genetics* 48 : 1059-1063. 1963.
- Mar C. Diferenciación Electroforética de Isozimas de Esterasa en 23 cepas de Escherichia coli. F.M.V.Z., U.N.A.M. tesis 1969.
- Martínez F.R. Estudio de Anhidrasa Carbónica Eritrocítica; Transferrinas y Esterasas Plasmáticas y su Polimorfismo - Genético en el ganado caprino. F.M.V.Z., U.N.A.M., tesis, 1975.
- Osterhoff, D.R., Schmid, D.O. y Ward-Cox, I.S. Blood Group and Serum Type Studies in Basutoes, Ponies. Proceedings of the Xith. European Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism, Varsovia. pp. 453-457. 1968.
- Oki, Y., Oliver, W.T., y Funnel, K.S. Multiple forms of - Cholinesterase in horse plasma. *Nature* 203 : 605-606. - 1964.
- Sandberg K. Genetic Polymorphism In Carbonic Anhydrase - form Horse Erythrocytes *Hereditas* 60 : 411-412. 1968.
- Sartore, G., Stormont, C. Morris, B.G. y Grunder, A.A. - Electrophoretic forms of Esterase and Carbonic Anhydrase in the red cells of cattle and bison. *Genetics* 61 : 823-831. 1969.
- Schleger, W. y Soos P. Serum Transferrin and Haemoglobin Polymorphism in Lipizzaner Horses. Proceedings of the - Xith. European Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism, Varsovia, pp. 477-480. 1968.
- Shaw, C.R., Syner, F.N. y Tashian, R.E. New Genetically - determined molecular form of erythrocyte esterase in man. *Science* 138 : 31-32. 1962.
- Smithies, O. y Hickman, C.G. Inherited Variations in the serum Proteins of cattle. *Genetics*. 43 : 374. 1958.

- Srb, A.M., Owen R.D. y Edgar R.S. General Genetics. 2ª Edición. Freeman. Sn. Francisco. 1965.
- Stormont C. y Suzyki Y. Paternity Test in Horses. The cornell Veterinarian, LV : 365-377. 1965.
- Stormont C. y Suzuki Y. Genetic Systems of Blood Groups in Horses. Genetics 50 : 915-929. 1964.
- Stormont C. y Suzuki Y. Genetic Control of Albumin Phenotypes in Horses. Proceedings of the society for experimental biology and medicine 114 : 673-675. 1963.
- Thorup, O. Jr., William B. Strole, y Byrd S. Leavell, A - Method for Localization of Catalase on Starch Gels. J. - Lab. & Clin. Med. 58 : 123-128. 1961.
- Tiselius, A. Trans. Faraday Soc. 33 : 524. 1937. Citado - por Nerenberg. S.T. Electrophoresis. A practical Laboratory Manual. F.A. Davis Co. Filadelfia. 1968.
- Tomaszewska - Guskiewics, K., y Zurkowski, M. Transferrin and Albumin Polymorphism in the Polish "Tarpan" Breed. -- Proceedings of the Xith. European Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism, Varsovia. pp. 473-475. 1968.
- Tucker, E.M., Suzuki, Y. and Stormont, C. Three new phenotypic systems in the blood of sheep - Vox sanguinis 13 : 264-262. 1967.
- Vollrath J. Diagnóstico de la Isoerretrolisis Neonatal en Equinos por pruebas Inmuniológicas. F.M.V.Z., U.N.A.M., - tesis. 1975.
- Zweig, G. y Whitaker, J.R. Paper Chromatography and Electrophoresis. Volume I. Electrophoresis in Stabilizing Media. Academic Press. N. York. 1967.