

ALGUNAS TRANSFERRINAS NO COMUNES EN BOVINOS

INDALECIO R. QUINTEROS (1-4)

EUGENIO D. TEJEDOR (1)

WILMER J. MILLER (2)

RICARDO H. LARRAMENDY (3)

PRESENTADO EN LOS CONGRESOS:

- a) Séptimo Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Genética (S.A.G.). Ushuaia, República Argentina, 12-17 de agosto de 1976.
- b) III Congreso Latinoamericano de Genética - Sociedad Latinoamericana de Genética - Montevideo, Uruguay, 6-12 de febrero de 1977.

RESUMEN

En un "muestreo" de 3.000 bovinos de distintas razas y mestizos provenientes de la Estación Experimental Agropecuaria de Balcarce (I.N.T.A.), (años 1970-1971), fueron detectados 10 fenotipos de Transferrinas "no-comunes" en esta especie animal. Uno de los fenotipos aparece con dos bandas proteicas lentas D_2 de las cuatro normales, constituyendo un tipo anormal de acuerdo con SPOONER Y BAXTER (1969). Estos autores refieren la acción de un gene epistático recesivo que afecta al ácido siálico vinculado a las dos bandas más veloces. Otros fenotipos se expresan con bandas agregadas y desplazamientos electroforéticos sobre gel de almidón hidrolizado, no coincidentes con los fenotipos conocidos. Frente a la inusitada rareza de los fenotipos observados, se decidió confirmar el hallazgo por marcación con Fe^{59} , demostrándose la veracidad del descubrimiento en vacunos de nuestro país.

SUMMARY

In a sample of 3.000 bovines of different breeds and half-breeds from the Estación Experimental Agropecuaria de Balcarce, I.N.T.A., (years 1970-1971), were detected 10 "not-common" Transferrin phenotypes in this animal species. One of the D_2 phenotypes appears with only two slow protein bands and not the four normal bands, constituting an abnormal type according with SPOONER AND BAXTER (1969). These authors refer the recessive epistatic gene action affecting the sialic acid binding to the two faster protein bands. Other phenotypes are expressed with aggregated bands and electrophoretic displacement on hydrolyzed starch gel not-coincident with the acquainted phenotypes. Because of the unusual rarity of the observed phenotypes, it was decided to confirm the finding with Fe^{59} added to every serum demonstrating the veracity of the discovery in bovines of our country.

(1) Instituto de Inmunogenética Animal y Genética, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, República Argentina.

(2) Department of Genetics, Iowa State University, Ames, Iowa 50010, U. S. A.

(3) Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

(4) Director del Instituto de Inmunogenética Animal y Genética.

Este trabajo se realizó con la vigencia de subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (C.O.N.I.C.E.T.), Comisión Administradora del Fondo de Promoción de la Tecnología Agropecuaria (C.A.F.P.T.A.) y la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires, República Argentina.

INTRODUCCION

El interés fundamental de la presentación de este trabajo, es informar acerca del hallazgo de varios fenotipos de transferrinas no comunes, detectados en un amplio muestreo de bovinos que comprendía distintas razas puras y mestizos, provenientes de la Estación Experimental Agropecuaria, I.N.T.A., Balcarce, las cuales fueron procesadas por los autores en el Laboratorio de Inmunogenética Animal de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Las muestras llegaron al laboratorio identificadas por un código numérico y letras, pero sin especificar proveniencia racial excepto algunos de los especímenes. En su conjunto, las razas utilizadas fueron Shorthorn, Hereford, Aberdeen Angus, Holando, Argentino, Fleckvieh Romagnola, etc.

Un ejemplo de suero con tipo anormal de Transferrina, ha sido descrito por GAHNE (1961) y otro tipo anormal de Transferrina detectado en bovinos indígenas de Piamonte fue publicado por SARTORE y BERNOCO (1966).

MAKARECHIAN y HOWELL (1966), comprobaron que todas las bandas visualizadas con colorantes de proteínas en la región de transferrinas en bovinos, detectadas por electroforesis sobre almidón hidrolizado, eran transportadoras de hierro, lo que fue certificado por autorradiografía.

Los fenotipos de transferrinas en bovinos de mayor frecuencia y sus combinaciones son: A, AD₁, AD₂, AE, D₁, D₁D₂, D₂, D₁E, D₂E y E. En gel de almidón hidrolizado, cada tipo homocigótico migra a la manera de "cuatro" proteínas diferentes (Ashton, 1959; Quinteros and Miller, 1968), exhibiendo los heterocigotes, combinaciones de cuatro tipos de bandas con distintas posiciones en la placa gelificada.

Investigaciones recientes sugieren que la síntesis y expresión de las Transferrinas están controladas por ocho aleles, conformando la serie multialélica Tf^{A1}, Tf^{A2}, Tf^B, Tf^{D1}, Tf^{D2}, Tf^F, Tf^E y Tf^G (Quinteros, 1976).

En esta presentación se describen genotipos no frecuentes y anormalidades en Transferrinas, un tanto similares a las mencionadas por SARTORE y BERNOCO (1966) y las enunciadas por SPOONER y BAXTER (1966). Estos últimos autores inducen que en los casos de supresión de dos bandas proteicas, actúa un gene recesivo epistático que afecta al ácido siálico vinculado a las dos bandas más veloces de las cuatro controladas por cada alele de Transferrina, cuyo control se ejerce desde un locus independiente al locus de Transferrina.

MATERIALES Y METODOS

Los fenotipos de Transferrinas que se exponen fueron determinados por electroforesis horizontal sobre gel de almidón hidrolizado, con algunas modificaciones al método descrito por KRISTJANSSON (1963), enunciadas por QUINTEROS y MILLER (1968).

En la tipificación de un muestreo correspondiente a 3.000 animales bovinos diferentes vinculados a la Estación Experimental de Balcarce (I. N.T.A.), transportadas al Laboratorio de Inmunogenética Animal para su procesamiento, aparecieron fenotipos de Transferrinas "no comunes" y "anormales", que por ser de especial interés, obliga a exponer en este Congreso su descubrimiento. La muestra 9-185 A4 provino de un bovino Aberdeen-Angus y la de código F1 720 de un animal de raza Fleckvieh. Las demás estaban protocolizadas de acuerdo con el código con que fueron presentadas al Laboratorio de Investigación.

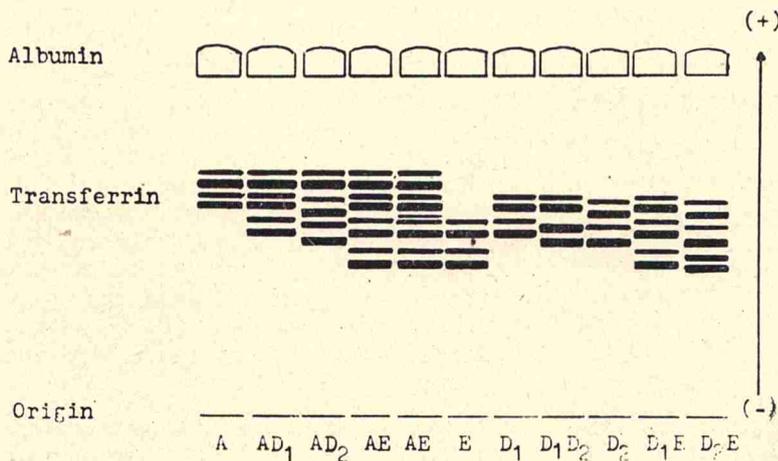
Frente a la inusitada rareza de los fenotipos aparecidos, se decidió confirmar por autorradiografía si las bandas aparecidas correspondían a fracciones proteicas de Transferrinas, para lo cual fue efectuada la marcación de cada muestra con Fe⁵⁹, en la proporción de 6 µ c/ml de suero problema, con incubación posterior a 37°C durante una hora. Efectuada la corrida electroforética, la tapa de 3 mm de espesor correspondiente al corte del total de la placa de gel de almidón hidrolizado y fijado con alcohol metílico, fue envuelta en bolsa de polietileno, colocando encima de la misma una película radiográfica Kodak durante 48 hs. SPOONER y BAXTER (1969) realizan la impresión de películas "Kodirex X-ray" a 4°C durante 16 horas.

Los resultados de la marcación fueron coincidentes con las bandas detectadas en el gel coloreado.

RESULTADOS

Previo a la presentación de los resultados, se hace necesario recordar los fenotipos normales de Transfe-

rrinas más frecuentes en bovinos (Figura 1).



PROTOCOLO N° 207... ESPECIE. BOVINO..... FECHA 21. Julio. 1976.....

S U E R O	Nº	T R A N S F E R R I N A			Hb	ALS
Aberdeen Angus 9-185 A4	1					
51105	2					
Fleekvieh Fl 720	3					
50043	4					
1187	5					
50393	6					
1147	7					
556	8					
0245	9					
51090	10					

Figura 2: Descripción diagramática de los fenotipos y genotipos de Transferrinas detectados.

Bovino

Expresión fenotipo y genotípica de transferrinas

1. Código N° 9-185 A4 En este individuo se destacan cuatro bandas netas del fenotipo A, precedidas de dos bandas tenues más veloces, transportadoras de hierro, confirmado por autorradiografía, expresándose con un fenotipo A fundamental definido de cuatro bandas más densas, precedido por dos bandas muy tenues más veloces agregadas. Aberdeen Angus.
2. Código N° 51105 El fenotipo de esta muestra es expresado por dos bandas rápidas muy tenues en la misma posición que el fenotipo anterior, seguido de cuatro bandas densas que corresponden a TfA y las cuatro bandas correspondientes a TfE, pero de menor intensidad que las de posición A. Se conforma un genotipo de TfA/TfE precedido de dos bandas ligeras, con aparentes diferencias de dosis de cada uno de los componentes heterocigóticos y enlentecimiento de las bandas E.
3. Código N° 720 Fenotipo de Tf-AD₂, con las dos bandas más rápidas de posición A extremadamente tenues, siendo densos los cuatro componentes proteicos restantes de este genotipo heterocigótico. Flekvieh.

*Bovino**Expresión feno y genotípica de transferrinas*

4. Código N° 50043 Corresponde a un genotipo heterocigótico TfD₁/TfE con la particularidad que las dos bandas proteicas más rápidas de posición D₁ son extremadamente tenues, las dos bandas lentas D₁ muy densas, y densidad evidentemente menor de las dos bandas en posición E.
5. Código N° 1187 Este curioso fenotipo anormal, está expresado sólo por las dos bandas más lentas del genotipo D₂. Los genotipos normales D₁D₁, D₁D₂ o D₂D₂ se expresan con cuatro bandas definidas. En este caso las dos bandas aparecidas son expresivamente densas. Hereford.
6. Código N° 50393 Este singular fenotipo "no común", de extrema rareza, está compuesto por ocho fracciones proteicas, cuyas cuatro bandas más veloces corresponden a la posición de las cuatro bandas del genotipo E, corriendo por detrás de E las cuatro bandas restantes. Las ocho bandas componentes, absolutamente definidas y visibles, son de densidad un tanto disminuida. Transitoriamente designamos a este genotipo como TfE/TfG, considerando la secuencia y número de bandas que corren detrás de E.
7. Código N° 1147 Este fenotipo se expresa con las seis bandas densas del genotipo heterocigótico TfA/TfD₂, pero precedido por las dos bandas muy tenues de los primeros fenotipos descritos en este trabajo.
8. Código N° 556 El fenotipo de este individuo aparece expresado con cinco bandas que corresponden al genotipo TfD₁/TfE, con la particularidad que la penúltima banda en posición E no aparece. En consecuencia, éste también es un tipo anormal.
9. Código N° 0245 Este fenotipo "no común" se expresa con cuatro bandas densas muy lentas, al que transitoriamente designamos como genotipo TfG/TfG homocigótico, en correspondencia a las cuatro bandas lentas del individuo N° 6 que hemos designado como TfE/TfG.
10. Código N° 51090 Fenotipo que se expresa con cuatro bandas de caprichosa ubicación, por lo cual presuponemos que corresponde a un genotipo anormal. Las dos bandas rápidas están ubicadas en posición de las dos bandas lentas del genotipo E, y las dos bandas lentas en posición de las dos bandas lentas del genotipo que hemos designado TfG, no expresándose las dos bandas rápidas de G que corresponderían a la estruc-

*Bovino**Expresión feno y genotípica de transferrinas*

turación del genotipo que transitoriamente podemos designar como TfF/TfG y que inferimos estaría constituido por seis fracciones proteicas, vale decir, en estado heterocigótico, cuyos componentes genotípicos podrían ser los siguientes: TfF, con dos bandas en posición de las dos bandas lentas del tipo E, que representarían las dos primeras bandas F, y dos bandas en posición de las dos bandas rápidas del tipo G, las cuales se acoplarían a las otras dos bandas de G que son las de mayor lentitud. Si la hipótesis concordara con la realidad, el fenotipo de este individuo estaría expresando un genotipo anormal, con las dos bandas proteicas intermedias suprimidas, (Figura 3).

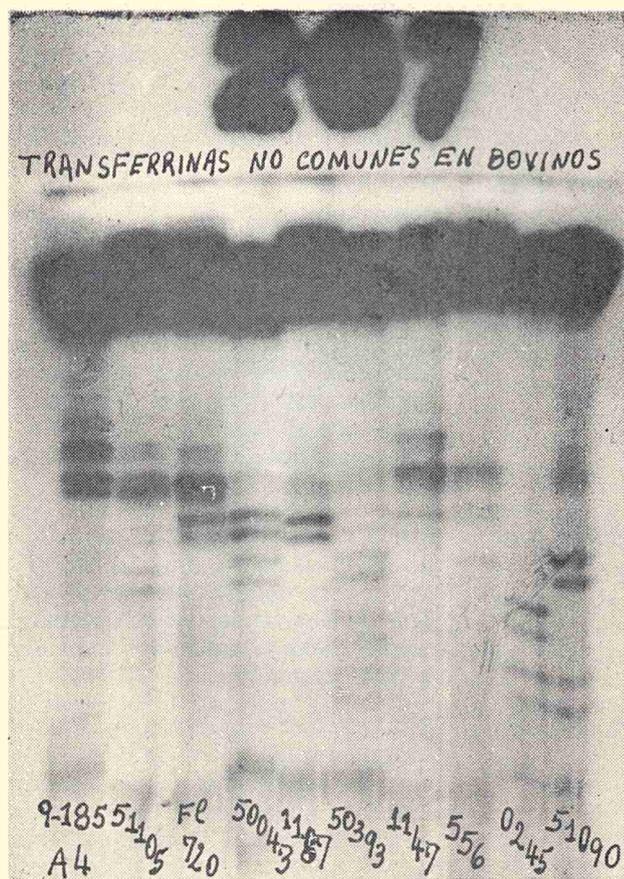


Figura 3: Fotografía de la tipificación en gel de almidón hidrolizado correspondiente al diagrama de la figura 2.

DISCUSION

Los tipos de Transferrinas del suero en bovinos detectados por electroforesis sobre almidón hidrolizado, muestran que la mayoría de los animales "encajan" en modelos definidos de cuatro, seis y ocho bandas de proteína por cada variante (Quinteros and Miller, 1968), aun cuando los cambios de técnicas utilizadas pueden modificar el fenotipo observado (Stormont, 1964).

En algunos animales se han comprobado variaciones fenotípicas expresadas con menor número de ban-

Spooner y Baxter (1969) describen siete casos de Transferrinas anormales en la raza Hereford, proponiendo que en esta anomalía las dos bandas proteicas que deben ser más veloces, aparentemente tienen igual movilidad que las dos bandas lentas del mismo genotipo, descubrimiento que fue realizado en los tipos Tf-A₂, Tf-D₁ y Tf-D₂.

En nuestro trabajo, la muestra 1187

Hereford) aparece con sólo dos bandas muy densas en posición de las dos bandas lentas del genotipo TfD₂.

SPOONER Y BAXTER (1969), inducen que en este tipo de animales afectados, hay cantidad duplicada de transferrina en las dos bandas lentas expresadas.

Se ha demostrado que el tratamiento de Transferrina normal con "neuraminidasa", produce enlentecimiento solamente de las bandas rápidas, de igual manera a como se observa en los caso anormales, sugiriendo que los primeros residuos de ácido siálico removidos por la "neuraminidasa", están débilmente adheridos a las dos bandas proteicas rápidas de Transferrina, siendo su adhesión firme respecto de las dos bandas lentas (Spooner and Baxter, 1969). Usando "neuraminidasa" en tratamiento prolongado, produjeron enlentecimiento de las Transferrinas anormales Tf-A₂A₂ y Tf-D₁D₁ (de dos bandas), reapareciendo las cuatro

bandas comunes en correspondencia a los genotipos normales de Tf-A₂A₂ y Tf-D₁D₁. Estos resultados los llevaron a interpretar que en esas Transferrinas anormales las dos bandas más rápidas en gel de almidón, tienen movilidades iguales a las dos bandas más lentas, produciéndose el fenómeno porque carecen del "ácido siálico", que normalmente transportan estas particulares fracciones proteicas del suero. Como consecuencia, sugieren que los animales afectados son homocigóticos para un gene epistático recesivo ubicado en un locus distinto no ligado al locus de Transferrina, el cual afecta el "transporte y adherencia" del ácido siálico a las dos bandas más rápidas. Los mismos autores plantean el interrogante acerca de "cuál es la diferencia de ligamiento" del ácido siálico a las dos bandas lentas de Transferrinas, induciendo que la anomalía podría ocurrir con respecto a otras bandas y genotipos homocigóticos y heterocigóticos.

La muestra F1 720 se expresa como un fenotipo Tf-AD₂, con las dos bandas rápidas sumamente débiles y la misma particularidad se observa en la muestra 50043 con las dos bandas rápidas ligeramente perceptibles y menor dosis que lo normal respecto a las dos bandas finales. Los individuos 9-185 A4, 51105 y 1147, de fenotipos Tf-AA, Tf-AE y Tf-AD₂, expresan dos bandas muy finas, certificadas por autorradiografía, todas en la misma posición por arriba de las bandas que corresponden al alelo Tf^A. Las muestras 556 y 51090, aparentemente se expresan como fenotipos anormales, donde en cierta forma se cumpliría la sugerencia de SPOONER y BAXTER de que las anomalías podrían ocurrir en los distintos genotipos heterocigóticos y no solamente en las bandas más veloces visualizadas en la corrida electrofórica sobre gel de almidón. Para

nuestro caso, en el individuo 556 se observa la ausencia de la segunda banda lenta del genotipo TfD₁/TfE, y referente a la muestra 51090, la ausencia corresponde a las dos bandas rápidas del alele Tf^G de este genotipo que integrarían el genotipo transitoriamente designado como TfF/TfG.

Las muestras 50393 y 0245, las catalogamos como fenotipos "no comunes", desconociendo los autores si sus correspondiente genotipos ya han sido descubiertos anteriormente a esta presentación. El individuo 50393 de ocho bandas, representa un genotipo heterocigótico compuesto por los alelos Tf^E y Tf^G, conformando el genotipo que denominamos TfE/TfG y

finalmente la muestra 0245, que se expresa en homocigosis con cuatro bandas muy lentas, transitoriamente hemos designado como genotipo TfG/TfG.

Con este trabajo dejamos planteadas las pautas para continuar investigando la probable aparición de otras anomalías de transferrinas en bovinos, y también, lo concerniente al descubrimiento de nuevos genotipos tal como comunicamos en este Congreso referente a las Transferrinas que hemos denominado TfE/TfG, Tff/TfG (presupone la existencia del genotipo Tff/Tff) y TfG/TfG homocigótico.

BIBLIOGRAFIA

1. ASHTON, G. C. 1959. Beta globulin alleles in Zebu Cattle. *Nature*, 184: 1135.
2. GAHNE, B. 1961. Studies on transferrins in serum and milk of Swedish cattle. *Animal Prod.* 3:135.
3. KRISTJANSSON, F. K. 1963. Genetics control of two pre-albumins in pigs. *Genetics*, 48:1059.
4. MAKARECHIAN, M. and HOWELL, W. E. 1966. Improved technique for separation and identification of bovine beta globulins by starch gel electrophoresis. *Can. J. Biochem Physiol.* 44:1089.
5. QUINTEROS, I. R. and MILLER, W. J. 1968. An alternative method in distinguishing cattle transferrin phenotypes. *Biochemical Genetics*, 2:213.
6. QUINTEROS, I. R. 1976. Estudio racial comparativo de marcadores genéticos en Bovinos Criollos. *Mendeliana* 1 (1976): 9.
7. SARTORE, G. and BERNOCO, D. 1966. Research on biochemical polymorphisms in the indigenous cattle of Piedmont. *Proc. Xth Eur. Congr. Anim. Blood Groups (Paris)*, 283.
8. SPOONER, R. L. and BAXTER, G. 1969. *Biochemical Genetics* 2:371.
9. STORMONT, C. 1964. A further comparison of bison and cattle transferrins. *Fed. Proc.* 23:557.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al señor Francisco ESPOSITO y Sra. Susana R. de COCONI, personal técnico del Instituto de Inmunogenética Animal y Genética, por su tarea de apoyo sin pausa, y al señor jefe del Servicio de MEDIOS AUDIOVISUALES de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, D. Julio BERMAN, por su excelente contribución fotográfica.